

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1996年2月20日

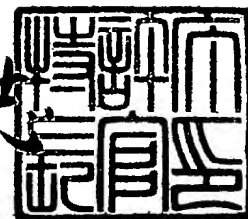
出願番号
Application Number: PCT/JP96/374号

出願人
Applicant (s): 雪印乳業株式会社
後藤雅昭
津田英資
望月伸一
矢野和樹
小林文枝
島伸行
保田尚孝
中川信明
森永伴法
上田正次
東尾侃二

1998年9月4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

佐山建志



出証平 10-500105

● 特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

受理官庁記入欄 国際出願番号	
国際出願日	
(受付印)	
出願人又は代理人の書面記号 (希望する場合は最大12字)	

SNOW-105

第I欄 発明の名称

新規蛋白質及びその製造方法

第II欄 出願人

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

雪印乳業株式会社

SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.

〒065 日本国北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

1-1, Naebocho 6-chome, Higashi-ku, Sapporo-shi,

Hokkaido 065 Japan

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追加欄に記載した指定国

第III欄 その他の出願人又は発明者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

後 藤 雅 昭 GOTO Masaaki

〒329-05 日本国栃木県下都賀郡石橋町下古山456-1

456-1, Shimokoyama, Ishibashimachi, Shimotsuga-gun,

Tochigi 329-05 Japan

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人である。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者である。
(ここに印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追加欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が縦欄に記載されている。

第IV欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

9094 弁理士 藤 野 清 也 FUJINO Seiya

10506 弁理士 児 玉 喜 博 KODAMA Yoshihiro

〒160 日本国東京都新宿区四谷1丁目2番1号

三浜ビル8階

Mitsuham Bldg., 8F, 2-1, Yotsuya 1-chome,

Shinjuku-ku, Tokyo 160 Japan

電話番号:

03-

3226-6671

ファクシミリ番号:

03-

3226-6673

加入電信番号:

☐ 代理人又は共通の代表者が選任されていないときに、通知が送付されるあて名を記載する場合はレ印を付す

第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この欄を使用しないときは、この用紙を裏面に添付する必要はない。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

津田 英資 TSUDA Eisuke

〒329-05 日本国栃木県下都賀郡石橋町石橋622

マロニエハイツ201

Maronie Heights 201, 622, Ishibashi, Ishibashimachi,

Shimotsuga-gun, Tochigi 329-05 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人である。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

望月 伸一 MOCHIZUKI Shin'ichi

〒329-04 日本国栃木県河内郡南河内町緑5-22-6

5-22-6, Midori, Minamikawachimachi, Kawachi-gun,

Tochigi 329-04 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人である。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

矢野 和樹 YANO Kazuki

〒329-05 日本国栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15

西浦ハイツ3-1

Nishiura Heights 3-1, 578-15, Ishibashi, Ishibashimachi,

Shimotsuga-gun, Tochigi 329-05 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人である。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

小林 文枝 KOBAYASHI Fumie

〒329-11 日本国栃木県河内郡河内町下岡本3777-4

3777-4, Shimookamoto, Kawachimachi, Kawachi-gun,

Tochigi 329-11 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人である。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が本欄に記載されている。

第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この欄を使用しないときは、この用紙を添付する必要はない。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

島 伸 行 SHIMA Nobuyuki
〒329-04 日本国栃木県河内郡南河内町緑4-17-5
4-17-5, Midori, Minamikawachimachi, Kawachi-gun,
Tochigi 329-04 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

保 田 尚 孝 YASUDA Hisataka
〒329-04 日本国栃木県河内郡南河内町緑2-3293-46
2-3293-46, Midori, Minamikawachimachi, Kawachi-gun,
Tochigi 329-04 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

中 川 信 明 NAKAGAWA Nobuaki
〒329-05 日本国栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15
西浦ハイツ2-4
Nishiura Heights 2-4, 578-15, Ishibashi, Ishibashimachi,
Shimotsuga-gun, Tochigi 329-05 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

森 永 伴 法 MORINAGA Tomonori
〒321-02 日本国栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12
11-12, Saiwaicho 3-chome, Mibumachi, Shimotsuga-gun,
Tochigi 321-02 Japan

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人である。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者である。
(ここに印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が本欄に記載されている。

第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この欄を使用しないときは、この用紙を添付する必要はない。

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

上 田 正 次 UEDA Masatsugu

〒350-11 日本国埼玉県川越市今福1672-1

メゾンむさし野719

Maison Musashino 719, 1672-1, Imafuku, Kawagoe-shi,

Saitama 350-11 Japan

この欄に記載した者は、
次に該当する:☐ 出願人である。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者である。
(ここに印を付したとき
は以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

東 尾 侃 二 HIGASHIO Kanji

〒350 日本国埼玉県川越市山田1769-10

1769-10, Yamada, Kawagoe-shi, Saitama

350 Japan

この欄に記載した者は、
次に該当する:☐ 出願人である。☒ 出願人及び発明者である。☐ 発明者である。
(ここに印を付したとき
は以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☒ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、
次に該当する:☐ 出願人である。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者である。
(ここに印を付したとき
は以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名:(姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、
次に該当する:☐ 出願人である。☐ 出願人及び発明者である。☐ 発明者である。
(ここに印を付したとき
は以下に記入しないこと)

国籍(国名):

住所(国名):

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:☐ すべての指定国☐ 米国を除くすべての指定国☐ 米国のみ☐ 追記欄に記載した指定国☐ その他の出願人又は発明者が続報に記載されている。

規則 4.9(a)の規定に基づき次の国を指定する（該当する□内にシ印を付すこと、及び少なくとも1国を指定すること）。

☐ AP ARIPO特許: KE ケニア Kenya, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, 及びハラレブプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国

- ☒ **EP** ヨーロッパ共同体: **AT** オーストリア Austria, **BE** ベルギー Belgium, **CH and LI** スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, **DE** ドイツ Germany, **DK** デンマーク Denmark, **ES** スペイン Spain, **FR** フランス France, **GB** 英国 United Kingdom, **GR** ギリシャ Greece, **IE** アイルランド Ireland, **IT** イタリア Italy, **L** ルクセンブルグ Luxembourg, **MC** モナコ Monaco, **NL** オランダ Netherlands, **PT** ポルトガル Portugal, **SE** スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ共同体と特許協力条約の締結国である他の国

- ☐ **OA OAPI 特許:** BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI 象牙海岸 Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, ML マリ Mali, MR モリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャド Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締結国である他の国(他のOAPI国を求めるときにこの欄上に記載する)

<input type="checkbox"/>	AM	アルメニア Armenia
<input type="checkbox"/>	AT	オーストリア Austria
<input checked="" type="checkbox"/>	AU	オーストラリア Australia
<input type="checkbox"/>	BB	バルバドス Barbados
<input type="checkbox"/>	BG	ブルガリア Bulgaria
<input type="checkbox"/>	BR	ブラジル Brazil
<input type="checkbox"/>	BY	ベラルーシ Belarus
<input checked="" type="checkbox"/>	CA	カナダ Canada
<input type="checkbox"/>	CH and LI	スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein
<input checked="" type="checkbox"/>	CN	中国 China
<input type="checkbox"/>	CZ	チェッコ Czech Republic
<input type="checkbox"/>	DE	ドイツ Germany
<input type="checkbox"/>	DK	デンマーク Denmark
<input type="checkbox"/>	ES	スペイン Spain
<input checked="" type="checkbox"/>	FI	フィンランド Finland
<input type="checkbox"/>	GB	英国 United Kingdom
<input type="checkbox"/>	GE	グルジア Georgia
<input checked="" type="checkbox"/>	HU	ハンガリー Hungary
<input checked="" type="checkbox"/>	JP	日本 Japan
<input type="checkbox"/>	KE	ケニア Kenya
<input type="checkbox"/>	KG	キルギスタン Kyrgyzstan
<input checked="" type="checkbox"/>	KR	韓国 Republic of Korea
<input type="checkbox"/>	KZ	カザフスタン Kazakhstan
<input type="checkbox"/>	LK	スリ・ランカ Sri Lanka
<input type="checkbox"/>	LT	リトアニア Lithuania
<input type="checkbox"/>	LU	ルクセンブルグ Luxembourg
<input type="checkbox"/>	LV	ラトヴィア Latvia
<input type="checkbox"/>	MD	モルドバ Republic Moldova

- | | | | |
|-------------------------------------|----|------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | MG | マダガスカル | Madagascar |
| <input type="checkbox"/> | MN | モンゴル | Mongolia |
| <input type="checkbox"/> | MW | マラウイ | Malawi |
| <input type="checkbox"/> | NL | オランダ | Netherlands |
| <input checked="" type="checkbox"/> | NO | ノールウェー | Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> | NZ | ニュー・ジーランド | New Zealand |
| <input type="checkbox"/> | PL | ポーランド | Poland |
| <input type="checkbox"/> | PT | ポルトガル | Portugal |
| <input type="checkbox"/> | RO | ルーマニア | Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> | RU | ロシア連邦 | Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> | SD | スーダン | Sudan |
| <input type="checkbox"/> | SE | スウェーデン | Sweden |
| <input type="checkbox"/> | SI | スロベニア | Slovenia |
| <input type="checkbox"/> | SK | スロヴァキア | Slovakia |
| <input type="checkbox"/> | TJ | タジキスタン | Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> | TT | トリニダード・トバゴ | Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> | UA | ウクライナ | Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> | US | 米国 | United States of America |
| <input type="checkbox"/> | UZ | ウズベキスタン | Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> | VN | ヴェトナム | Viet Nam |

下の欄は、この目次の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- [illegible]

の指定を除き、特許協力条約の規定

により認められたすべての締約国を規則 4.9(b)の規定に基づき指定する。

出願人は、これらの指定が優先日から15月が経過する前に確認されない指定はこの期間が経過するときに出願人によって取り下げられたものとすることを宣言する（指定の確認は、指定を特定する通知並びに指定手数料及び確認手数料の納付から構成される。確認は、優先日から15月以内に受理官庁に提出されなければならない）。

第VI欄 優先権の主張

他の優先権の主張が特許庁に記録されている ☐

記の先の出願に基づく優先権を主張する

国名 (その国において又はその 国について出願がされた)	先の出願の日 (日・月・年)	先の出願の番号	先の出願がされた官庁名 (広域出願又は国際出願のみ)
(1) 日本国 JAPAN	20.02.95	平成7年特許願 第54977号	
(2) 日本国 JAPAN	21.07.95	平成7年特許願 第207508号	
(3)			

先の出願が、本件国際出願について受理官庁である国内官庁に対して行われたときは、出願人は、手数料の納付を条件に以下を請求する。

☐ 上記の先の出願のうち次の番号の出願書類の認定原本を作成し国際事務局へ送付することを特許庁長官に請求している。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

ISA/JP

先の特許権 国際調査機関による調査 (国際・国際型又はその他) を既に請求しており、可能な限り当該調査の結果を国際調査の基礎とすることを請求する場合に記入する。関連する出願 (若しくはその継承) 又は関連する調査請求を表示することにより当該調査又は請求を特定する。

国名 (又は広域官庁)

出願日 (日・月・年)

番号

第VIII欄 頁数合算欄

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

1. 願書	6 枚
2. 明細書	161 枚
3. 請求の範囲	6 枚
4. 要約書	1 枚
5. 図面	12 枚
合計	186 枚

出願時におけるこの国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- | | |
|--|--|
| 1. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 5. <input checked="" type="checkbox"/> 所定の手数料の納付 |
| 2. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し | <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 |
| 3. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) の説明書 | <input type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 |
| 4. <input type="checkbox"/> 上記第VI欄に記載された優先権書類
(具体的に記載する): | 6. <input checked="" type="checkbox"/> 寄託した微生物に関する書面
ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リスト
(フレキシブルディスク) |
| | 7. <input type="checkbox"/> その他 (具体的に記載する) |
| | 8. <input type="checkbox"/> |

要約書とともに公表する図として 第 _____ 図 を提示する (図面がある場合)

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名を記載し、その次に押印する。願書により資格が明白に表示されていない場合はその者が押印している資格を表示する。

藤野 清也



児玉 喜博



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日

受理官庁記入欄

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつて

その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA/JP

6. ☐調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された☐ 不足図面がある

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

P C T

手数料計算用紙

題 附 属

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の書類記号

SNOW-105

受理官庁の日付印

出願人

雪印乳業株式会社

所定の手数料の計算

1. 2. 法第18条第1項第1号の規定による手数料

95,000 円 T+S

3. 国際手数料

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 186 枚

最初の30枚まで

67,400 円 b1

156 × 1,300 =

202,800 円 b2

30枚を超える用紙の枚数 用紙1枚の手数料

b1及びb2に記入した金額を加算し合計額をBに記入

270,200 円 B

指定手数料

13 × 16,400 =

180,400 円 D

指定国数 指定手数料
 (合計が指定手数料の10倍に相当する金額を越えるときは、
 Dの中にはその10倍の金額を記入する。)

B及びDに記入した金額を加算し合計額をIに記入

450,600 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

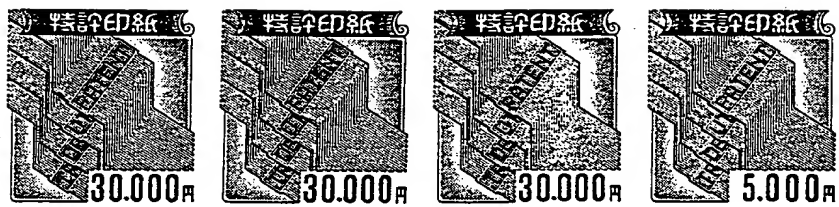
T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

545,600 円

合 計

(注意1) 法第18条第1項第1号の規定による手数料については、特許用紙をもって納付しなければならない。

(注意2) 国際手数料については、特許庁長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。



送付手数料・調査手数料 95,000円

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

〔 特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約 〕

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 雪印乳業株式会社 生物科学研究所
所長 竹下 保義
寄託者 殿
あ て 名 ㊦ 329-05
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林
519 番地

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)
pBK/01F10

(受託番号)
FERM BP- 5267

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☐ 科学的性質
☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 7 年 6 月 21 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、平成 7 年 6 月 21 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。
そして、平成 7 年 10 月 25 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。
(平成 7 年 6 月 21 日に寄託された微工研菌寄第 P- 14998 号より移管)

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Industrial Science and Technology

所長 大石 道夫
Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL

あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 7 年 (1995) 10 月 25 日

明 細 書

新規蛋白質及びその製造方法

技 術 分 野

本発明は、破骨細胞の分化及び／又は成熟を抑制する活性を示す新規な蛋白質、即ち破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF) 及びその製造方法に関する。

従 来 の 技 術

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している、骨代謝の異常により発生する疾患の代表として、骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は、骨芽細胞による骨形成を、破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質 (サイトカイン) への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー (fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987)、インシュリン様増殖因子-I (insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J.M.

et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II : McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989)、アクチビンA (Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン (Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.199, p380, 1994) 、及び異所骨形成因子ファミリー(bone morphogenetic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992、Knutsen R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993) 等のサイトカインが報告されている。

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988) やインターロイキン-4 (interleukin-4; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993) 等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992) 、マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J.Cell. Physiol. vol.137, p199, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- γ (interferon- γ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986) 等が報告されている。

これらのサイトカインは、その骨形成の促進や骨吸収の抑制作用による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。

現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床で

は活性型ビタミンD₃、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イプリフラボン、ビタミンK₂（メナテトレノン）又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらの薬剤を用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。前述したように、骨代謝は骨形成と骨吸収のバランスによって調節されており、破骨細胞の分化・成熟を抑制するサイトカインは、骨粗鬆症等の骨量減少症の治療薬となることが期待される。

発 明 の 開 示

本発明はこのような観点からなされたものであって、新規な破骨細胞形成抑制因子（OCIF）及びその効率的な製造方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、このような現状に鑑み鋭意探索の結果、ヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90（ATCC寄託—受託番号CCL186）の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性を有する蛋白質OCIFを見出すに至った。

又、細胞培養の担体としてアルミナセラミック片を使用すると本発明の破骨細胞形成抑制因子OCIFを培地中に高濃度に蓄積せしめ、効率よく精製できることを見出した。

さらに、本発明者らは、前記培養液をイオン交換カラム、アフィニティークラム及び逆相カラムで順次処理して吸着及び溶出をくり返すことによって前記蛋白質OCIFを効率よく精製する方法を確立した。

次に本発明者らは、得られた天然型OCIF蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づき、この蛋白質をコードするcDNAのクローニングに成功した。さらに本発明者らは、このcDNAを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を生産する方法を確立するに至った。

本発明は、ヒト胎児肺線維芽細胞に由来し、還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD、非還元条件下SDS-PAGEにおける分子量が約60kD及び約120kDであり、陽イオン交換体及びヘパリンカラムに親和性を有し、70℃、

10分間又は56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟を抑制する活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われることを特徴とする蛋白質に関する。本発明の蛋白質OCIFのアミノ酸配列は、既知の破骨細胞形成抑制因子とは明確に相違する。

また、本発明は、ヒト線維芽細胞を培養し、培養液をヘパリンカラム処理し、吸着画分を溶出し、この画分を陽イオン交換カラムにかけ吸着・溶出し、さらにアフィニティーカラム、逆相カラムによって精製して前記蛋白質を採取する、蛋白質OCIFの製造方法に関する。本発明におけるカラム処理は、単に培養液等をヘパリンセファロースカラム等に流下させるものばかりではなく、バッチ法で培養液をヘパリンセファロース等と混合し、カラム処理した場合と同等の効果を奏するものも包含する。本発明で使用されるアフィニティーカラムは、ヘパリンカラム及びブルーカラムが挙げられる。ブルーカラムは、特に好ましくはシバクロンブルーカラムが挙げられる。このシバクロンブルーカラムの充填剤としては、親水性合成高分子を担体とし色素シバクロンブルーF3GAを結合させたものが例示され、このカラムは通常ブルーカラムと呼ばれる。

さらに、本発明は、アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なって効率よく前記蛋白質を製造する方法に関する。

本発明の蛋白質OCIFは、ヒト線維芽細胞の培養液から効率良く且つ高収率で単離精製することができる。この原料からの本発明蛋白質OCIFの単離、精製は、生物試料からの蛋白性物質の精製に汎用される通常の方法を用いて、目的とする蛋白質OCIFの物理的、化学的性質を利用した各種の精製操作に従い実施することができる。この濃縮手段として限外濾過、凍結乾燥、及び塩析等の通常の生化学的処理手段が挙げられる。又、精製手段としては、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、調製用電気泳動等を用いた通常の蛋白性物質の精製に利用される各種の手法を組み合わせる用いることができる。特に好ましくは、原料として用いるヒト線維芽細胞としてヒト胎児肺線維芽細胞IMR-90(ATCC-CCL 186)を用いることが望ましい。そして原料とな

るヒト胎児肺線維芽細胞 I M R - 90 の培養は、ヒト胎児肺線維芽細胞 I M R - 90 をアルミナセラミック片に付着させ、5 % ウシ新生児血清を添加した D M E M 培地を培養液として用い、ローラーボトル中で一週間から10日程度静置培養することにより得たものを使用するとよい。又、精製処理を実施する際に界面活性剤として0.1 % C H A P S (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate) を添加して精製を行うのが望ましい。

本発明の蛋白質 O C I F は、先ず培養液をヘパリンカラム (ヘパリン-セファロース C L - 6 B、ファルマシア社) にかけて、2M NaCl を含む10mM Tris-HCl 緩衝液、pH7.5 で溶出させ、ヘパリン吸着性の O C I F 画分を得、この画分を Q・陰イオン交換カラム (HiLoad-Q/FF、ファルマシア社) にかけて、その非吸着画分を集めることにより、ヘパリン吸着性で塩基性の O C I F 画分として得ることができる。得られた O C I F 活性画分は S・陽イオン交換カラム (HiLoad-S/HP、ファルマシア社)、ヘパリンカラム (ヘパリン-5 P W、トーソー社)、シバクロンブルーカラム (ブルー-5PW、トーソー社)、逆相カラム (BU-300 C4、パーキンエルマー社) にかけることにより単離・精製することができ、この物質は前述した性質によって特定される。

さらに、本発明は、このようにして得られた天然型 O C I F 蛋白質のアミノ酸配列に基づいてこの蛋白質をコードする c D N A をクローニングし、この c D N A を用いて遺伝子工学的手法で破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質 O C I F を得る方法に関する。

即ち、本発明の方法に従って精製した O C I F 蛋白質をエンドプロテアーゼ (例えばリシルエンドペプチダーゼ) で処理後、生ずるペプチドのアミノ酸配列を決定し、得られた内部アミノ酸配列をコードし得るオリゴヌクレオチドの混合物を作製する。

次に、作製したオリゴヌクレオチド混合物をプライマーとし、P C R 法 (好ましくは R T - P C R 法) を利用して O C I F c D N A 断片を取得する。この O C I F c D N A 断片をプローブとして、c D N A ライブラリーより O C I F の全長 c D N A をクローニングする。得られた O C I F c D N A を発現ベクターに挿入して O C I F 発現プラス

ミドを作製し、これを各種の細胞又は菌株に導入して発現させることにより、組換え型OCIFを製造することができる。

本発明はまた、上述の活性を有する本発明OCIF蛋白質の類縁体（バリエーション）である新規蛋白質 OCIF2, OCIF3, OCIF4, OCIF5 に関する。

これらの類縁体は、IMR-90細胞のポリ(A) + RNAを用いて作成したcDNAライブラリーをOCIFcDNA断片をプローブとしてハイブリダイズすることによって得られる。これらのOCIF類縁体のcDNAを発現ベクターに挿入し、そのOCIF類縁体発現ベクターを通常の宿主で発現し、常法で精製することにより、目的とする類縁体蛋白質を得ることができる。

又、本発明はOCIF変異体に関する。

これらの変異体はOCIFの二量体形成に関与する可能性のあるCys 残基をSer 残基に置換したもの、又は天然型OCIFに欠失変異を導入したものである。PCR法或いは制限酵素による切断により、OCIFcDNAに置換或いは欠失変異を導入する。このcDNAを適当な発現プロモーターを有したベクターに挿入し、哺乳動物細胞等の真核細胞にトランスフェクトし、この細胞を培養してその培養液から常法により精製することにより、目的とするOCIF変異体を得られる。

又、本発明は抗OCIFポリクローナル抗体、及びそれを用いたOCIFの測定方法に関する。

抗OCIFポリクローナル抗体は、OCIFを免疫原として常法により作製される。この時用いる抗原（免疫原）としては、IMR-90培養液より得られる天然型OCIF、及びOCIFcDNAを用いて微生物や真核細胞を宿主として生産された遺伝子組み換え型OCIF、あるいはOCIFのアミノ酸配列に基づいて設計した合成ペプチドや、OCIFの加水分解部分ペプチドを用いることができる。これらの抗原を用いて、また必要ならば免疫アジュバントを併用して、適当な哺乳動物を免疫し、その血清から常法により精製することにより、抗OCIFポリクローナル抗体を得ることができる。得られた抗OCIFポリクローナル抗体をアイソトープや酵素で標識することにより、ラジオイムノアッセイ(RIA) やエンザイムイムノアッセイ(EIA) の測定系に使用することができる。この測定系を用い

ることにより、血液や腹水などの生体試料や細胞培養液などのOCIF濃度を容易に測定することができる。

又、本発明は抗OCIFモノクローナル抗体、及びそれを用いたOCIFの測定方法に関する。

抗OCIFモノクローナル抗体は、OCIFを免疫原として、常法により作成される。抗原としては、IMR-90培養液より得られる天然型OCIF、及びOCIFcDNAを用いて微生物や真核細胞を宿主として生産された遺伝子組み換え型OCIF、或いはOCIFのアミノ酸配列に基づいて設計した合成ペプチドや、OCIFの加水分解部分ペプチドでもよい。これらの抗原を用いて哺乳動物を免疫するか、或いはインビトロ法により免疫した細胞を、哺乳動物の骨髓腫細胞（ミエローマ）などと融合させハイブリドーマを作製し、このハイブリドーマよりOCIFを認識する抗体を産生するクローンを選択し、このクローンを培養することにより目的とする抗体が得られる。ハイブリドーマの作製にあたっては、哺乳動物を使用する場合、マウスやラットなどの小動物を使用した例が一般的である。免疫は、OCIFを生理食塩水などにより適当な濃度に希釈し、この溶液を静脈内や腹腔内に投与し、これに必要に応じて免疫アジュバントを併用投与し、動物に2-20日毎に2-5回投与する。このようにして免疫された動物を、解剖し、脾臓を摘出し脾細胞を免疫細胞として使用する。

免疫細胞と細胞融合させるマウス由来のミエローマとしては、例えばP3/x63-Ag8, p3-U1, NS-1, MPC-11, SP-2/0, F0, P3x63Ag8. 653, S194などが例示できる。また、ラット由来の細胞としてはR-210などの細胞株を例示できる。ヒト型の抗体を生産する場合にはヒトBリンパ球をインビトロ法により免疫し、ヒトミエローマ細胞やEBウイルスにより形質転換した細胞株を親株として使用することによりヒト型の抗体を生産するハイブリドーマを得ることができる。

免疫細胞とミエローマ細胞株の融合は公知の方法、例えばKoehlerとMilsteinらの方法（Koehler, G. et al. Nature vol. 256, 495-497, 1975）、或いは電気パルス法などが挙げられる。免疫細胞とミエローマ細胞株は、細胞培養に用いられている培地（FBS不含）に、通常行われている細胞数の比に混合し、ポリエ

チレングリコールを添加して融合処理を行い、HAT選択培地で培養を行い融合細胞を選択することができる。

抗OCIF抗体生産株を選別するには、ELISA法、プラーク法、オクタロニー法、凝集法など、通常の抗体検出に使用されている方法を用いて選択することができる。このようにして選別されたハイブリドーマは、通常の培養方法により継代培養可能であり、必要に応じて凍結保存できる。ハイブリドーマを常法により培養するか、または哺乳動物の腹腔内に移植することにより、抗体を生産することができる。抗体は塩析、ゲル濾過やアフィニティークロマトグラフィーなどの通常の方法により精製できる。

得られた抗体はOCIFに特異的に反応し、OCIFの測定や精製に使用できる。OCIFの測定に使用する場合は、抗体をアイソトープや酵素によりラベルすることにより、ラジオイムノアッセイ(RIA)やエンザイムイムノアッセイ(EIA)の測定系に使用することができる。特に本発明により得られる抗体は、その抗原認識部位がそれぞれ異なっているので、サンドイッチイムノアッセイに使用することができるという特徴を有する。この測定系を用いることにより、血液や腹水などの生体試料や細胞培養液などのOCIF濃度を容易に測定することができる。

OCIF活性は、久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・酵素, Vol.34, p999 (1989))及びTakahashi N. et al. の方法(Endocrinology, Vol.122, p1373 (1988))に従い測定することができる。即ち、生後約17日のマウス骨髓細胞を標的細胞として用い、活性型ビタミンD₃(Calcitriol)存在下での破骨細胞の形成抑制を、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導の抑制で試験することができる。

本発明の蛋白質である破骨細胞形成抑制因子OCIFは、骨粗鬆症等の骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症等の骨代謝異常疾患、或いは多発性骨髓腫等の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋

白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子OCIFを有効成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。

医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理学的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子OCIFとこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

図面の簡単な説明

第1図は、HiLoad-Q/FF 非吸着画分粗精製製品（試料3）をHiLoad-S/HP カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

第2図は、ヘパリン-5PW粗精製製品（試料5）をブルー-5PWカラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

第3図は、ブルー-5PW溶出フラクション49～50を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

第4図は、最終精製品の還元条件下と非還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。

符号の説明

レーン1、4；分子量マーカー

レーン2、5；ピーク6

レーン3、6；ピーク7

第5図は、還元ピリジルエチル化後、リシルエンドプロテアーゼ処理したピーク7を逆相カラムにかけた時の溶出プロファイルを示す。

第6図は、天然(n) 及び組み換え型(r) OCIFの、非還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。又、(E) は293/EBNA細胞で生産したものを、

(C) はCHO細胞で生産したものをそれぞれ示す。

符号の説明

レーン1 ; 分子量マーカー

レーン2 ; モノマー型nOCIF

レーン3 ; ダイマー型nOCIF

レーン4 ; モノマー型rOCIF (E)

レーン5 ; ダイマー型rOCIF (E)

レーン6 ; モノマー型rOCIF (C)

レーン7 ; ダイマー型rOCIF (C)

第7図は、天然型(n)及び組み換え型(r)OCIFの、還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。又、(E)は293/EBNA細胞で生産したものを、(C)CHO細胞で生産したものをそれぞれ示す。

符号の説明

レーン8 ; 分子量マーカー

レーン9 ; モノマー型nOCIF

レーン10 ; ダイマー型nOCIF

レーン11 ; モノマー型rOCIF (E)

レーン12 ; ダイマー型rOCIF (E)

レーン13 ; モノマー型rOCIF (C)

レーン14 ; ダイマー型rOCIF (C)

第8図は、N-結合型糖鎖を除去した天然型(n)及び組み換え型(r)OCIFの、還元条件下におけるSDS-PAGEの結果を示す。又、(E)は293/EBNA細胞で生産したものを、(C)はCHO細胞で生産したものをそれぞれ示す。

符号の説明

レーン15 ; 分子量マーカー

レーン16 ; モノマー型nOCIF

レーン17 ; ダイマー型nOCIF

レーン18 ; モノマー型rOCIF (E)

レーン19 ; ダイマー型 r O C I F (E)

レーン20 ; モノマー型 r O C I F (C)

レーン21 ; ダイマー型 r O C I F (C)

第9図は、O C I F と O C I F 2 の、アミノ酸配列の比較を示す。

第10図は、O C I F と O C I F 3 の、アミノ酸配列の比較を示す。

第11図は、O C I F と O C I F 4 の、アミノ酸配列の比較を示す。

第12図は、O C I F と O C I F 5 の、アミノ酸配列の比較を示す。

第13図は、抗 O C I F ポリクローナル抗体を用いた時の、O C I F の検量線を示す。

第14図は、抗 O C I F モノクローナル抗体を用いた時の、O C I F の検量線を示す。

第15図は、O C I F の骨粗鬆症に対する治療効果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。しかしこれらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

〔実施例1〕

ヒト線維芽細胞 I M R - 90 培養液の調製

ヒト胎児肺線維芽細胞 I M R - 90 (ATCC-CCL186) は、ローラーボトル (490cm²、110 × 171mm、コーニング社) 中で 80g のアルミナセラミック片 (アルミナ 99.5%、東芝セラミック社) に付着させ培養した。培養には 60 個のローラーボトルを使用し、ローラーボトル 1 個当たり 5% 子牛血清を添加した 10mM H E P E S 緩衝液添加 D M E M 培地 (ギブコ B R L 社) 500ml を用い、37℃、5% CO₂ 存在下で 7~10 日間静置培養した。培養後培養液を回収し、新たな培地を添加することにより 1 回の培養で 301 の I M R - 90 培養液を得た。得られた培養液を試料 1 とした。

〔実施例2〕

破骨細胞形成抑制活性の測定法

本発明の蛋白性破骨細胞形成抑制因子の活性測定は久米川正好らの方法（蛋白質・核酸・酵素 Vol.34 p999(1989)）及びTakahashi N. et al. の方法（Endocrinology vol.122 p1373 (1988)）に従い測定した。即ち、生後約17日のマウスより分離した骨髓細胞を用い、活性型ビタミンD₃存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導を指標として試験し、その抑制活性を測定することによって行った。即ち、96ウェルマイクロプレートに 2×10^{-8} M活性型ビタミンD₃及び10%牛胎児血清を含む α -MEM培地（ギブコBRL社）で希釈したサンプル 100 μ lを入れ、生後約17日のマウスから得た骨髓細胞 3×10^5 個を100 μ lの10%牛胎児血清を含む α -MEM培地に懸濁させて播種し、5%CO₂、37℃、湿度 100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液 160 μ lを廃棄し、 1×10^{-8} M活性型ビタミンD₃及び10%牛胎児血清を含む α -MEM培地で希釈したサンプル 160 μ lを添加した。培養7日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン（1：1）溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット（Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログNo.387-A、シグマ社）を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。

〔実施例3〕

OCIFの精製

i) ヘパリン・セファロースCL-6Bによる精製

約90 lのIMR-90培養液（試料1）を、0.22 μ mのフィルター（親水性ミリディスク、2,000cm²、ミリポア社）で濾過した後、3回に分けて0.3M NaClを含む10mM Tris-HCl 緩衝液（以下、Tris-HClという）、pH7.5で平衡化させたヘパリン・セファロースCL-6B カラム（5×4.1cm、ゲル容量80ml）にかけた。流速500ml/hrにて、10mM Tris-HCl、pH7.5で洗浄した後、2M NaClを含む10mM Tris-HCl、pH7.5で溶出を行い、ヘパリン・セファロースCL-6B 吸着画分900mlを得、得られた画分を試料2とした。

ii) Hi Load-Q/FFによる精製

ヘパリン・セファロース吸着画分（試料2）を10mM Tris-HCl、pH7.5 に対し

て透析した後、0.1 %になるようにCHAPSを加え4℃で一晩放置したものを、2回に分けて0.1 % CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で平衡化した陰イオン交換カラム(HiLoad-Q/FF、2.6 ×10cm、ファルマシア社)にかけ、非吸着画分1000mlを得た。得られた画分を試料3とした。

iii) HiLoad-S/HPによる精製

HiLoad-Q非吸着画分(試料3)を、0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で平衡化した陽イオン交換カラム(HiLoad-S/HP、2.6 ×10cm、ファルマシア社)にかけた。0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で洗浄した後、100分間でNaClを1Mにする直線勾配、流速8ml/分にて溶出を行い、12ml/フラクションにて分取を行った。フラクション1~40を10フラクションづつ4つの画分にまとめ、それぞれ100μlを用いてOCIF活性を測定した。OCIF活性はフラクション11~30に認められた(図1: 図中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30~80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことをそれぞれ示す)。より比活性の高いフラクション21~30を試料4とした。

iv) アフィニティーカラム(ヘパリン-5PW)による精製

120mlの試料4を240mlの0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で希釈した後、0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で平衡化したアフィニティーカラム(ヘパリン-5PW、0.8 ×7.5 cm、トーソー社)にかけた。0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション50μlを用いてOCIF活性を測定し、約0.7~1.3M NaClで溶出されるOCIF活性画分10mlを得、試料5とした。

v) アフィニティーカラム(ブルー-5PW)による精製

10mlの試料5を190mlの0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で希釈した後、0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で平衡化したアフィニティーカラム(ブルー-5PW、0.5 ×5.0cm、トーソー社)にかけた。0.1 %CHAPSを含む50mM Tris-HCl、pH7.5で洗浄した後、60分間でNaClを2Mにする直線

勾配、流速0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション25 μ lを用いてOCIF活性を測定し、約1.0～1.6M NaClで溶出されるOCIF活性フラクション49～70を得た（図2 図中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を示す）。

vi) 逆相カラムによる精製

得られたフラクション49～50mlに、10 μ lの25%TFA（トリフルオロ酢酸）を加えた後、0.1%TFAを含む25%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム（BU-300、C4、2.1 \times 220mm、パーキンエルマー社）にかけ、60分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速0.2ml/分にて溶出を行い、各ピークを分取した（図3）。各ピークフラクションの100 μ lを用いてOCIF活性を測定し、ピーク6及びピーク7に濃度依存的に活性を検出した。結果を表1に示す。

第1表 逆相カラムから溶出されたOCIF活性

希釈率	1/40	1/20	1/360	1/1080
ピーク6	++	++	+	—
ピーク7	++	+	—	—

（表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、—は活性が検出されないことを示す。）

〔実施例4〕

OCIFの分子量測定

OCIF活性の認められたピーク6及びピーク7各40 μ lを用い、還元条件下と非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。即ち、各ピークフラクション20 μ lづつを2本のチューブに分取し減圧濃縮した後、1mM EDTA、2.5%SDS、及び0.01%ブロモフェノールブルーを含む10mM Tris-HCl, pH8 1.5 μ lで溶解し、それぞれを非還元条件下及び還元条件下（5% 2-メルカプトエタノール存在下）で37℃で一晩放置後、それぞれの1 μ lをSDS

ーポリアクリルアミドゲル電気泳動に負荷した。電気泳動は10-15%アクリルアミドのグラジエントゲル(ファルマシア社)を使用し、電気泳動装置Phast System(ファルマシア社)を用いて行った。分子量マーカーとして、ホスホリラーゼb(94kD)、ウシ血清アルブミン(67kD)、オボアルブミン(43kD)、カルボニックアンヒドラーゼ(30kD)、トリプシンインヒビター(20.0kD)、 α -ラクトアルブミン(14.4kD)を用いた。電気泳動終了後、Phast Gel Silver Stain Kit(ファルマシア社)を用いて銀染色を行った。結果を図4に示す。

その結果、ピーク6については還元条件下、非還元条件下で約60kDの蛋白質のバンドが検出された。又、ピーク7については、還元条件下で約60kD、非還元条件下で約120kDaの蛋白質のバンドが検出された。従って、ピーク7はピーク6の蛋白質のホモダイマーであると考えられる。

〔実施例5〕

OCIFの熱安定性試験

ブルー5PWフラクション51~52を混合したサンプルから20 μ lずつを取り、10mMリン酸塩緩衝生理食塩水、pH7.2 30 μ lを加えた後、70℃及び90℃にて10分間、又は56℃にて30分間熱処理を行った。このサンプルを用い、実施例2記載の方法に従いOCIF活性を測定した。結果を表2に示す。

第2表 OCIFの熱安定性

希 釈 率	1/300	1/900	1/2700
未処理	++	+	-
70℃10分	+	-	-
56℃30分	+	-	-
90℃10分	-	-	-

(表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30~80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。)

〔実施例6〕

内部アミノ酸配列の決定

ブルー5 PWフラクション51~70について、2フラクションづつを混合して1 mlとし、それぞれの試料に10 μ l の25% TFAを加えた後、1 mlずつ10回にわけて0.1 % TFAを含む25%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム (BU-300、C4、2.1 \times 220mm、パーキンエルマー社) にかけて、60分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速 0.2 ml/分にて溶出を行い、ピーク6とピーク7を集めた。得られたピーク6とピーク7の一部について、それぞれプロテインシーケンサー (プロサイス、494型、パーキンエルマー社) を用い、N末端アミノ酸配列分析を行ったが、分析不能でありこれらの蛋白質のN末端はブロックされている可能性が示唆された。そこで、これらの蛋白質の内部アミノ酸配列を解析した。即ち、ピーク6とピーク7のそれぞれを遠心濃縮した後、それぞれに 100 μ g ジチオスレイトール、10mM EDTA、7 M塩酸グアニジン、及び1% CHAPSを含む 0.5M Tris-HCl, pH8.5 50 μ l を加えて室温で4時間放置し還元した後、0.2 μ l の4-ビニルピリジンを加え、室温暗所で一晩放置しピリジルエチル化した。これらのサンプルに1 μ l の25% TFAを加え、0.1 % TFAを含む20%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム (BU-300, C4, 2.1 \times 30mm, パーキンエルマー社) にかけて、30分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.3 ml/分で溶出を行い、還元ピリジルエチル化OCIFサンプルを得た。還元ピリジルエチル化したサンプルのそれぞれを遠心濃縮し、8M尿素及び0.1% Tween80を含む0.1M Tris-HCl, pH9 25 μ l で溶解した後、73 μ l の0.1M Tris-HCl, pH9 で希釈し、0.02 μ g のAP1 (リシルエンドプロテアーゼ、和光純薬社) を加え、37 $^{\circ}$ Cで15時間反応させた。反応液に1 μ l の25% TFAを加え、0.1 % TFAで平衡化した逆相カラム (RP-300, C8, 2.1 \times 220mm、パーキンエルマー社) にかけて、70分間でアセトニトリル濃度を50%にする直線勾配、流速0.2 ml/分で溶出を行い、ペプチドフラグメントを得た (図5)。得られたペプチドフラグメント (P1~P3) について、プロテインシーケンサーを用いアミノ酸配列分析を行った。結果を配列表 配列番号1~3に示す。

[実施例 7]

c DNA 配列の決定

i) IMR-90細胞からのポリ(A) + RNA の単離

IMR-90細胞のポリ(A) + RNA は、ファストトラック mRNA アイソレーションキット（インヴィトロジェン社）を用い、そのマニュアルに準じて単離した。この方法により 1×10^8 個の IMR-90 細胞より約 $10 \mu\text{g}$ のポリ(A) + RNA を取得した。

ii) ミックスプライマーの作製

先に得られたペプチド（配列表 配列番号 2 及び 3）のアミノ酸配列をもとに、次の 2 種のミックスプライマーを合成した。即ち、ペプチド P 2（配列番号 2 のペプチド）の 6 番目(Gln) から 12 番目(Leu) までのアミノ酸配列をコードするすべての塩基配列を持つオリゴヌクレオチドの混合物（ミックスプライマー, No.2F）を合成した。又、ペプチド P 3（配列番号 3 のペプチド）の 6 番目(His) から 12 番目(Lys) までのアミノ酸配列をコードするすべての塩基配列に対する相補的オリゴヌクレオチドの混合物（ミックスプライマー, No.3R）を合成した。用いたミックスプライマーの塩基配列を、表 3 に示す。

第 3 表

=No.2F =

5'-CAAGAACAAA CTTTCAATT-3'
G G G C C GC
A
G

=No.3R =

5'-TTTATACATT GTAAAAGAAT G-3'
C G C G GCTG
A C
G T

iii) OCIFcDNA断片のPCR による増幅

実施例 7-i) で得たポリ(A) + RNA、 $1 \mu\text{g}$ を鋳型としてスーパースクリプト II c DNA 合成キット（ギブコ BRL 社）を用いて、同社のプロトコールに従っ

て一本鎖 cDNA を合成し、この cDNA と実施例 7-i) で示したプライマーを用いて、PCR を行い、OCIFcDNA 断片を取得した。以下に条件を示す。

10X Ex Taq バッファー (宝酒造社)	5	μ l
2.5 mM dNTP	4	μ l
cDNA 溶液	1	μ l
Ex Taq (宝酒造社)	0.25	μ l
蒸留水	29.75	μ l
40 μ M プライマー No.2F	5	μ l
40 μ M プライマー No.3R	5	μ l

上記の溶液を微量遠心チューブ中で混合後、以下の条件で PCR を行った。95℃ で 3 分前処理後、95℃ 30 秒、50℃ 30 秒、70℃ 2 分の 3 段階の反応を 30 回繰り返したのち、70℃ 5 分保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動し約 400bp の均一な DNA 断片が得られたことを確認した。

〔実施例 8〕

PCR により増幅された OCIFcDNA 断片のクローニング及び塩基配列決定

実施例 7-iii) で得られた OCIFcDNA 断片を、Marchuk, Dらの方法 (Nucleic Acid Res., Vol.19, p1154, 1991) によってプラスミド pBluescript II SK⁻ (ストラタジーン社) に DNA ライゲーションキット Ver.2 (宝酒造社) を用いて挿入し、大腸菌 DH5 α (ギブコ BRL 社) の形質転換を行った。得られた形質転換株を増殖させ、約 400bp の OCIFcDNA 断片が挿入されたプラスミドを常法に従い精製した。このプラスミドを pBSOCIF と名付け、このプラスミドに挿入されている OCIFcDNA の塩基配列をタックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit; パーキンエルマール社) を用いて決定した。この OCIFcDNA の大きさは、397 bp であった。この塩基配列から予測される 132 個のアミノ酸からなるアミノ酸配列中に、ミックスプライマーを設計するのに用いた OCIF の内部アミノ酸配列 (配列表配列番号 2 及び 3) をそれぞれ N 末側、C 末側に見出すことができた。又、OCIF の内部アミノ酸配列 (配列番号 1) を、この 132 個のアミノ酸からなるアミノ酸配列中に

見出すことができた。以上の結果より、クローニングした397 bpの cDNA は、OCIFcDNA断片であることが確認された。

〔実施例 9〕

DNAプローブの作製

実施例 8 で作成された397bp のOCIFcDNA断片が挿入されたプラスミドを鋳型にして実施例 7 -iii)の条件でPCRを行なうことにより、このOCIFcDNA断片を増幅した。アガロース電気泳動により397bp のOCIFcDNA断片を分離後、QIAEX ゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。このDNA をメガプライムDNAラベリングキット（アマシャム社）を用いて [α 32 P]dCTP で標識し、全長のOCIFcDNAをスクリーニングするためのプローブとして用いた。

〔実施例 10〕

cDNAライブラリーの作成

実施例 7 -i)で得られたポリ(A) + RNA、2.5 μ g を鋳型としてグレートレングス cDNA 合成キット（クロンテック社）を用いて同社のプロトコルに従い、oligo(dT)primer を用いて cDNA の合成、EcoRI-SalI-Not-Iアダプター付加、cDNA サイズフラクショネーションを行いエタノール沈殿の後10 μ l のTEバッファーに溶解した。得られたアダプター付加 cDNA、0.1 μ g をT4DNA リガーゼを用いてあらかじめEcoRI で切断した1 μ g の λ ZAP エクスプレスベクター（ストラタジーン社）に挿入した。このようにして得られた cDNA 組み換えファージDNA 溶液をギガバックゴールドII（ストラタジーン社）を用いてインヴィトロパッケージング反応に供し、 λ ZAP エクスプレス組み換えファージを作成した。

〔実施例 11〕

組み換えファージのスクリーニング

実施例 10 で得られた組み換えファージを37℃で15分間大腸菌 XL1-Blue MRF'（ストラタジーン社）に感染させたのち、50℃に加温した0.7 %の寒天を含むNZY 培地に添加し、NZY 寒天培地プレートに流しこんだ。37℃で一晩培養後、プールの生じたプレート上にハイボンドN（アマシャム社）を約30秒密着させた。

このフィルターを常法に従いアルカリ変性の後、中和し、2XSSC 溶液に浸したのちUVクロスリンク（ストラタジーン社）によりDNA をフィルターに固定化した。得られたフィルターを100 μ g/mlのサケ精子DNA を含むハイブリダイゼーションバッファー（アマシャム社）に浸漬し65℃で4 時間前処理した後、熱変性した上記DNA プローブ(2X10⁵cpm/ml) を添加した上記バッファーに移し替え65℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。反応後フィルターを2XSSC で2 回、0.1XSSC, 0.1% SDS溶液で2回それぞれ65℃で10分間洗浄した。得られたいくつかの陽性クローンを、さらに2 回スクリーニングを行うことにより純化した。それらの中から約1.6kb のインサートを持つものを以下に用いた。この純化したファージを λ OCIFと名付けた。純化した λ OCIFを λ ZAP エクスプレスクローニングキット（ストラタジーン社）のプロトコールに従い、大腸菌XL1-Blue MRF' に感染させたのち、ヘルパーファージExAssist（ストラタジーン社）で多重感染を行い、その培養上清を大腸菌XL0LR(ストラタジーン社) に感染させたのちカナマイシン耐性株を拾うことによりpBKCMV（ストラタジーン社）に上述の1.6kb のインサートが挿入されたプラスミドpBKOCIF をもつ形質転換株を得た。この形質転換株はpBK/01 F10 として、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5267（平成7年10月25日にFERM P-14998の原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託に移管）として寄託してある。このプラスミドをもつ形質転換株を増殖させ、常法によりプラスミドを精製した。

〔実施例12〕

OCIFの全アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列の決定

実施例11で得られたOCIFcDNAの塩基配列をタックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット（パーキンエルマー社）を用いて決定した。用いたプライマーはT3, T7 プライマー（ストラタジーン社）及びOCIFcDNAの塩基配列に基づいて設計された合成プライマーであり、その配列を配列表配列番号16～29に示す。

決定されたOCIFの塩基配列を配列番号6に、その配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号5にそれぞれ示す。

〔実施例 13〕

293/EBNA細胞による組み換え型OCIFの生産

i) OCIFcDNAの発現プラスミドの作製

実施例 11 で得られた約1.6kb のOCIFcDNAが挿入されたプラスミドpBKOCIF を制限酵素BamHI 及びXhoIで消化し、OCIFcDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、Q I A E X ゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。このOCIFcDNAを、あらかじめ制限酵素BamHI 及びXhoIで消化しておいた発現プラスミドpCEP4（インヴィトロジェン社）に、ライゲーションキット Ver.2（宝酒造社）を用いて挿入し、大腸菌DH5 α （ギブコBRL社）の形質転換を行った。得られた形質転換株を増殖させ、OCIFcDNAが挿入された発現プラスミドpCEPOCIFをキアゲンカラム（キアゲン社）を用いて精製した。OCIF発現プラスミドpCEPOCIFをエタノールによって沈澱させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

ii) OCIFcDNAのトランジェントな発現及びその活性の測定

実施例 13-i) で得られたOCIF発現プラスミドpCEPOCIFを用いて、以下に述べる方法で組み換えOCIFを発現させ、その活性を測定した。 8×10^5 個の293/EBNA細胞（インヴィトロジェン社）を6ウェルプレートの各ウェルに10%牛胎児血清（ギブコBRL社）を含むIMDM培地（ギブコBRL社）を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清IMDM培地で細胞を洗った。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン（ギブコBRL社）添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地（ギブコBRL社）を用いて希釈しておいたpCEPOCIFとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。用いたpCEPOCIF及びリポフェクタミンの量はそれぞれ3 μ g 及び12 μ l であった。38時間後、培地を除き1mlの新しいOPTI-MEM培地を加え、さらに30時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は以下のようにして行った。生後約17日のマウス骨髄細胞からの活性型ビタミンD₃存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、OCIFの活性とした。すなわ

ち、96ウェルマイクロプレートに 2×10^{-8} M 活性型ビタミン D₃ 及び 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地（ギブコ BRL 社）で希釈したサンプル 100 μ l を入れ、生後約 17 日のマウス骨髄細胞 3×10^5 個を 100 μ l の 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地に懸濁させて播種し、5% CO₂、37℃、湿度 100% にて一週間培養した。培養 3 日目と 5 日目に、培養液 160 μ l を廃棄し、 1×10^{-8} M 活性型ビタミン D₃ 及び 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地で希釈したサンプル 160 μ l を添加した。培養 7 日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール／アセトン（1：1）溶液で細胞を室温にて 1 分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット（Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログ No. 387-A、シグマ社）を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少を OCIF 活性とした。その結果、表 4 に示すように、先に IMR-90 の培養液から得られた天然型 OCIF と同様の活性をこの培養液が有することが確認された。

第 4 表 293/EBNA 細胞で発現させた培養液中の OCIF 活性

希釈率	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
OCIF							
遺伝子導入	++	++	++	++	++	+	-
ベクター導入	-	-	-	-	-	-	-
未処理	-	-	-	-	-	-	-

（表中、++ は破骨細胞形成が 80% 以上抑制される活性を、+ は破骨細胞形成が 30～80% 抑制される活性を、- は活性が検出されないことを示す。）

iii) 293/EBNA 細胞由来組み換え型 OCIF の精製

実施例 13-ii) に記載した 293/EBNA 細胞を大量培養して得た培養液 1.8l に 0.1% になるように CHAPS を加え、0.22 μ m のフィルター（ステリベックス GS、ミリポア社）で濾過した後、10mM Tris-HCl, pH7.5 で平衡化させた 50ml のヘパリン・セファロース CL-6B カラム（2.6×10cm、ファルマシア社）にか

けた。0.1 % CHAPS を含む 10mM Tris-HCl, pH7.5 で洗浄した後、100 分間で NaCl を 2M にする直線勾配、流速 4 ml/分にて溶出を行い、8ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション 150 μ l を用いて実施例 2 の方法に従って OCIF 活性を測定し、約 0.6~1.2M NaCl で溶出される OCIF 活性画分 112ml を得た。

得られた OCIF 活性画分 112ml を 0.1 % CHAPS を含む 10mM Tris-HCl, pH7.5 で 1000ml に希釈した後、0.1 % CHAPS を含む 10mM Tris-HCl, pH7.5 で平衡化させたアフィニティカラム (ヘパリン -5PW, 0.8 \times 7.5 cm、トーソー社) にかけた。0.1 % CHAPS を含む 10mM Tris-HCl, pH7.5 で洗浄した後、60 分間で NaCl を 2M にする直線勾配、流速 0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。

得られたフラクション各 4 μ l を用いて実施例 4 の方法に従って還元及び非還元条件下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その結果、フラクション 30~32 には還元条件下で約 60kD、非還元条件下で約 60kD と約 120kD の OCIF バンドのみが検出されたので、フラクション 30~32 を集め純化 293/EBN A 細胞由来組み換え型 OCIF (rOCIF(E)) 画分とした。BSA をスタンダードとして用いたローリー法による蛋白定量の結果、535 μ g/ml の rOCIF(E) 1.5ml が得られたことが明らかになった。

〔実施例 14〕

CHO 細胞による組み換え型 OCIF の生産

i) OCIF の発現プラスミドの作製

実施例 11 で得られた約 1.6kb の OCIFcDNA が挿入されたプラスミド pBKOCIF を制限酵素 SalI 及び EcoRV で消化し、約 1.4kb の OCIFcDNA 断片を切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX ゲルエクストラクションキット (キアゲン社) を用いて精製した。又、発現ベクター pcDL-SR α 296 (Molecular and Cellular Biology, Vol.8, pp466-472, 1988) を制限酵素 PstI 及び KpnI で消化し、約 3.4kb の発現ベクター DNA 断片をアガロース電気泳動によって分離後、QIAEX ゲルエクストラクションキット (キアゲン社) を用いて精製した。D

NAブランディングキット（宝酒造社）を用いて、これらの精製したOCIFcDNA断片と発現ベクターDNA断片の末端を平滑化した。次に、ライゲーションキット Ver.2（宝酒造社）を用いて、平滑化された発現ベクターDNA断片にOCIFcDNA断片を挿入し、大腸菌DH5 α （ギブコBRL社）の形質転換を行い、OCIF発現プラスミドpSR α OCIFをもつ形質転換株を得た。

ii) 発現プラスミドの調製

実施例13-i)で得られたOCIF発現プラスミドpSR α OCIFをもつ形質転換株及びWO92/01053号公報に示されるマウスDHF R 遺伝子発現プラスミドpBAdSVをもつ形質転換株をそれぞれ常法を用いて増殖させ、Maniatisら（Molecular cloning, 2nd edition）の方法に従いアルカリ法及びポリエチレングリコール法で処理し、塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した。

iii) CHOdhFr⁻細胞の蛋白質不含培地への馴化

10%牛胎児血清（ギブコBRL社）を含むIMDM培地（ギブコBRL社）で継代されていたCHOdhFr⁻細胞（ATCC-CRL9096）は、無血清培地EX-CELL301（JRHバイオサイエンス社）で馴化後、さらに蛋白質不含培地EX-CELL PF CHO（JRHバイオサイエンス社）で馴化させた。

iv) OCIF発現プラスミド及びDHF R 発現プラスミドのCHOdhFr⁻細胞への導入

実施例14-ii)で調製したOCIF発現プラスミドpSR α OCIF及びDHF R 発現プラスミドpBAdSVを用いて実施例14-iii)で調製したCHOdhFr⁻細胞を下記に示すエレクトロポレーション法により形質転換した。pSR α OCIFプラスミド200 μ gとpBAdSVプラスミド20 μ gを無菌的に10%牛胎児血清（ギブコBRL社）を含むIMDM培地（ギブコBRL社）0.8mlに溶解後、この0.8mlを用いて2 \times 10⁷個のCHOdhFr⁻細胞を浮遊させた。この細胞浮遊液をキューベツト（バイオラッド社）に入れ、ジーンパルサー（バイオラッド社）を用いて、360V、960 μ Fの条件でエレクトロポレーション法により形質転換を行った。10mlのEX-CELL PF CHO培地の入った浮遊細胞用Tフラスコ（住友ベークライト社）にエレクトロポレーション済の細胞浮遊液を移し、CO₂インキュベーター中で2日間培

養した。EX-CELL PF CHO培地を用いて5000cells/wellの濃度で96ウェルマイクロプレートにまき、約2週間培養した。EX-CELL PF CHO培地を核酸は含まず、この培地では親株のCHOdhFr⁻は増殖できないので、DHFRを発現する細胞株だけが選択されてくる。OCIF発現プラスミドをDHFR発現プラスミドの10倍量用いているので、DHFRを発現する細胞株の大部分はOCIFを発現する。得られたDHFRを発現する細胞株から培養上清中のOCIF活性の高い細胞株を、実施例2で示した測定法によってスクリーニングした。得られたOCIF高生産株につきEX-CELL PF CHO培地を用いて限界希釈法により細胞のクローニングを行い、得られたクローンについて培養上清中のOCIF活性の高い細胞株をスクリーニングし、OCIF高生産クローン5561を得た。

v) 組み換え型OCIFの生産

組み換えOCIF (rOCIF) の生産するため、EX-CELL 301 培地31に形質転換CHO細胞 (5561) を 1×10^5 cells/ml となるように接種し、スピナーフラスコを用いて37℃で4、5日培養した。細胞の濃度が約 1×10^6 cells/ml になったところで、約2.71の培地を回収した。約2.71のEX-CELL 301 培地を加え、培養を繰り返した。3基のスピナーフラスコを用い、約201の培養液を採取した。

vi) CHO細胞由来組み換え型OCIFの精製

実施例14-(v) で得られた培養液11に0.1%になるようにCHAPSを加え、0.22μmのフィルター(ステリベックスGS、ミリポア社)で濾過した後、10mM Tris-HCl, pH7.5で平衡化させた50mlのヘパリン・セファロースFFカラム(2.6×10cm、ファルマシア社)にかけた。0.1%CHAPSを含む10mM Tris-HCl, pH7.5で洗浄した後、100分間でNaClを2Mにする直線勾配、流速4ml/分にて溶出を行い、8ml/フラクションにて分取を行った。各フラクション150μlを用いて実施例2の方法に従ってOCIF活性を測定し、約0.6~1.2Mで溶出されるOCIF活性画分112mlを得た。

得られたOCIF活性画分112mlを0.1%CHAPSを含む10mM Tris-HCl, pH7.5で1200mlに希釈した後、0.1%CHAPSを含む10mM Tris-HCl, pH7.5で平衡化させたアフィニティカラム(ブルー-5PW, 0.5×5cm、トーソー社)に

かけた。0.1 % CHAPSを含む 10mM Tris-HCl, pH7.5 で洗浄した後、90分間でNaClを3Mにする直線勾配、流速0.5ml/分にて溶出を行い、0.5ml/フラクションにて分取を行った。

得られたフラクション各4 μ l を用いて実施例4の方法に従って還元及び非還元条件下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その結果、フラクション30~38には還元条件下で約60kD、非還元条件下で約60kDと約120kDのOCIFバンドのみが検出されたので、フラクション30~38を集め精製CHO細胞由来組み換え型OCIF〔rOCIF(C)〕画分とした。BSAをスタンダードとしたローリー法による蛋白定量の結果、113 μ g/mlのrOCIF(C) 4.5 mlが得られたことが明らかになった。

〔実施例15〕

組み換え型OCIFのN末端構造解析

3 μ gの精製rOCIF(E)及びrOCIF(C)を、プロスピン(ProSpin, パーキンエルマー社)を用いてポリビニリデンジフルオリド(PVDF)膜に固定し、20%メタノールで洗浄した後、プロテインシーケンサー(プロサイス、492型、パーキンエルマー社)を用いてN末端アミノ酸配列分析を行った。結果を配列表配列番号7に示す。

rOCIF(E)とrOCIF(C)のN末端アミノ酸は、配列表配列番号5に記載したアミノ酸配列の翻訳開始点Metから22番目のGluで、MetからGlnまでの21アミノ酸はシグナルペプチドであることが明らかになった。又、IMR-90培養液から精製し得られた天然型OCIFのN末端アミノ酸配列が分析不能であったのは、N末端のGluが培養中又は精製中にピログルタミン酸に変換したためと考えられた。

〔実施例16〕

組み換え型(r)OCIF及び天然型(n)OCIFの生物活性

i) マウス骨髄細胞系での、ビタミンD₃で誘導される破骨細胞形成の抑制

96ウェルマイクロプレートに、 2×10^{-8} M活性型ビタミンD₃及び10%牛胎児血清を含む α -MEM培地(ギブコBRL社)で250ng/mlから連続的に二分の一希釈した精製rOCIF(E)及びnOCIF 100 μ lを入れた。このウェルに生後約17日の

マウス骨髓細胞 3×10^5 個を $100 \mu\text{l}$ の10%牛胎児血清を含む α -MEM培地に懸濁させて播種し、5% CO_2 、 37°C 、湿度 100%にて一週間培養した。培養7日後に、実施例2の方法に従って酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログNo.387-A, シグマ社)を用いた染色を行い破骨細胞形成を検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少率は、染色した細胞の色素を可溶化し、その吸光度を測定することにより算出した。即ち、細胞を固定し染色した各ウェルに0.1N水酸化ナトリウム-ジメチルスルフォキシド混合液(1:1) $100 \mu\text{l}$ を加えよく振盪した。色素を十分に溶解させた後、マイクロプレートリーダー(イムノリーダーNJ-2000、インターメッド社)を用い、測定波長 590nm、対照波長 490nmにて吸光度を測定した。又、吸光度を測定する際のブランクウェルとして、ビタミンD₃未添加のウェルを用いた。結果は、OCIF未添加のウェルでの吸光度値を100とした百分率値で表し、表5に示す。

第5表 マウス骨髓細胞系でのOCIFによる
破骨細胞形成抑制(ビタミンD₃)

OCIF濃度(ng/ml)	250	125	63	31	16	0
rOCIF(E)	0	0	3	62	80	100
nOCIF	0	0	27	27	75	100

nOCIFと同様にrOCIF(E)にも、16ng/ml以上の濃度で用量依存的な破骨細胞形成抑制活性が見られた。

ii) ストローマ細胞とマウス脾臓細胞の共培養系でのビタミンD₃で誘導される破骨細胞形成の抑制

ビタミンD₃で誘導されるストローマ細胞とマウス脾臓細胞の共培養系での破骨細胞形成の試験は、宇田川らの方法(Endocrinology, Vol. 125, p1805-1813, 1989)に従って行った。即ち、96ウェルマイクロプレートに $2 \times 10^{-8}\text{M}$ 活性型ビタミンD₃、 $2 \times 10^{-7}\text{M}$ デキサメサゾン及び10%牛胎児血清を含む α -MEM培地(ギブコBRL社)で、連続的に希釈した精製 rOCIF(E)、rOCIF(C) 及びnOCIF

100 μ lを入れた。このウェルにマウス骨髓由来ストローマ細胞株 S T 2 細胞 (RIKEN Cell Bank-RCB0224) 5×10^3 個と生後約 8 週間の ddyマウス脾臓細胞 1×10^5 個を 100 μ l の 10%牛胎児血清を含む α -M E M 培地に懸濁させて播種し、5 %CO₂、37℃、湿度 100%にて 5 日間培養した。培養 5 日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後、エタノール/アセトン (1 : 1) 溶液で細胞を室温にて 1 分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット (Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログ No.387-A, シグマ社) を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少を O C I F 活性とした。又、酸性ホスファターゼ活性陽性細胞数の減少率は実施例 16-i) に記載した方法に従って染色された細胞の色素を溶解させて算出した。rOCIF (E) と rOCIF (C) を用いて試験した結果を表 6 に、rOCIF (E) と nOCIF を用いて試験した結果を表 7 に、それぞれ示す。

第 6 表 ストローマ細胞とマウス脾臓細胞の共培養系での OCIF による破骨細胞形成抑制

OCIF 濃度 (ng/ml)	50	25	13	6	0
rOCIF (E)	3	22	83	80	100
rOCIF (C)	13	19	70	96	100

第 7 表 ストローマ細胞とマウス脾臓細胞の共培養系での OCIF による破骨細胞形成抑制

OCIF 濃度 (ng/ml)	250	63	16	0
rOCIF (E)	7	27	37	100
nOCIF	13	23	40	100

nOCIF と同様に rOCIF (E) 及び rOCIF (C) についても、6 ~ 16 ng/ml 以上の濃度で容量依存的な破骨細胞形成抑制活性が見られた。

iii) PTHで誘導される破骨細胞形成の抑制

PTHで誘導される破骨細胞形成の試験は、高橋らの方法 (Endocrinology, Vol.122, p1373-1382, 1988)に従って行った。即ち、6 ウェルマイクロプレートに 2×10^{-8} M PTH 及び 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地 (ギブコ BRL 社) で、125ng/ml から連続的に希釈した nOCIF 及び精製 rOCIF(E) 100 μ l を入れた。このウェルに生後約 17 日のマウス骨髄細胞 3×10^5 個を 100 μ l の 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地に懸濁させて播種し、5% CO₂、37°C、湿度 100% にて 5 日間培養した。培養 5 日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン (1:1) 溶液で細胞を室温にて 1 分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット (Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログ No.387-A, シグマ社) を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少を OCIF 活性とした。又、酸性ホスファターゼ活性陽性細胞数の減少率は実施例 16-i) に記載した方法に従って染色された細胞の色素を溶解させて算出した。結果を表 8 に示す。

第 8 表 マウス骨髄細胞系での OCIF による破骨細胞形成抑制 (PTH)

OCIF 濃度 (ng/ml)	125	63	31	16	8	0
rOCIF(E)	6	58	58	53	88	100
nOCIF	18	47	53	56	91	100

nOCIF と同様に rOCIF(E) についても、16ng/ml 以上の濃度で容量依存的な破骨細胞形成抑制活性が見られた。

iv) IL-11 で誘導される破骨細胞形成の抑制

IL-11 で誘導される破骨細胞形成の試験は、田村らの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.90, p11924-11928, 1993)に従って行った。即ち、96 ウェルマイクロプレートに 20ng/ml IL-11 及び 10% 牛胎児血清を含む α -MEM 培地 (ギブコ BRL 社製) で希釈した nOCIF 及び精製 rOCIF(E) 100 μ l を入れた。このウェルにマウス新生児頭蓋骨由来前脂肪細胞株 MC3T3-G2/PA6 細胞 (RIKEN Cell Bank-

RCB1127) 5×10^3 個と生後約8週間の ddyマウス 脾臓細胞 1×10^5 個を $100 \mu\text{l}$ の10%牛胎児血清を含む α -MEM培地に懸濁させて播種し、5% CO_2 、 37°C 、湿度100%にて5日間培養した。培養5日後にリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン(1:1)溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte、カタログ No.387-A, シグマ社)を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞数を計測し、その減少をOCIF活性とした。結果を表9に示す。

第9表 IL-11で誘導される酒石酸存在下での
酸性ホスファターゼ活性陽性細胞数

濃度(ng/ml)	500	125	31	7.8	2.0	0.5	0
nOCIF	0	0	1	4	13	49	31
rOCIF(E)	0	0	1	3	10	37	31

nOCIF 及びrOCIF(E)とも、 2ng/ml 以上の濃度で容量依存的にIL-11で誘導される破骨細胞形成を抑制する活性が見られた。

このように種々の標的細胞を用いた破骨細胞形成の試験系において、OCIFはビタミンD₃、PTH、及びIL-11等の破骨細胞形成誘導因子による破骨細胞の形成をほぼ同じ濃度で抑制することが明らかになった。従って、OCIFはこのような様々な骨吸収促進物質で誘導される異なるタイプの骨量減少症の治療に、効果的に使用出来る可能性が示唆された。

〔実施例17〕

モノマー型及びダイマー型OCIFサンプルの調製

rOCIF(E)及びrOCIF(C)それぞれ $100 \mu\text{g}$ を含むサンプルに、1/100容量の25% TFA(トリフルオロ酢酸)を加えた後、0.1% TFAを含む30%アセトニトリルで平衡化した逆相カラム(PROTEIN-RP、 $2.0 \times 250\text{mm}$ 、ワイエムシー社)にかけ、50分間でアセトニトリルを55%にする直線勾配、流速 0.2ml/分 にて溶出を行い、各OCIFピークを分取した。得られたピーク画分を凍結乾燥すること

により、モノマー型OCIF及びダイマー型OCIFを得た。

〔実施例18〕

組み換え型OCIFの分子量測定

実施例3-vi)の方法で逆相カラムを用いて精製したモノマー型及びダイマー型nOCIFと実施例17記載の方法で精製したモノマー型及びダイマー型rOCIF約1 μ gを含むサンプルを減圧濃縮した。これらのサンプルにつき、実施例4の方法でSDS処理、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動、及び銀染色を行った。非還元条件下及び還元条件下で電気泳動した結果を、図6及び図7にそれぞれ示す。

その結果、非還元条件下では、何れのモノマー型サンプルでも60kDの蛋白質バンドが検出され、又、何れのダイマー型サンプルでも120kDの蛋白質バンドが検出された。又、還元条件下では何れのサンプルでも約60kDの蛋白質バンドのみが検出された。従って、IMR-90細胞由来nOCIF、293/EBNA細胞由来組み換え型OCIF、及びCHO細胞由来組み換え型OCIFの各々のモノマー型とダイマー型の分子量はほぼ同一であることが示された。

〔実施例19〕

IMR-90細胞由来天然型OCIFと組み換え型OCIFのN-結合型糖鎖の除去と分子量測定

実施例3-vi)の方法で逆相カラムを用いて精製したモノマー型及びダイマー型nOCIFと実施例17記載の方法で精製したモノマー型及びダイマー型rOCIFの各々を約5 μ g含むサンプルを減圧濃縮した。これらのサンプルに100mM 2-メルカプトエタノールを加えた50mMリン塩緩衝液、pH8.6, 9.5 μ lを加えて溶解させ、更に250U/ml N-グリカナーゼ溶液（生化学工業社）0.5 μ lを加え37℃で一日放置した。これらのサンプルに2mM MEDTA、5%SDS、及び0.02%プロモフェノールブルーを含む20mM Tris-HCl, pH8.0, 10 μ lを加え、100℃で5分間加熱した。これらのサンプルの1 μ lを実施例4の方法でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動した後、銀染色した。結果を図8に示す。

その結果、N-グリカナーゼ処理によりN-結合糖鎖を除去したOCIF蛋白

質の還元条件下での分子量は、いずれも約40kDであることが示された。糖鎖除去の処理を行っていないIMR-90細胞由来nOCIF, 293/EBNA細胞由来rOCIF、及びCHO細胞由来rOCIFの各々の還元条件下での分子量はいずれも約60kDであることから、これらのOCIFはその分子内にN-結合糖鎖を含有する糖蛋白質であることが明らかになった。

〔実施例20〕

OCIF類縁体（バリエント）cDNAのクローニング及び塩基配列の決定

実施例10及び11で示したように、純化したいいくつかの陽性ファージのひとつからpBKCMV（ストラタジーン社）にOCIFcDNAが挿入されたプラスミドpBKOCIFを持つ形質転換株を得たが、その際、他のいくつかの陽性ファージからも長さの異なるインサートが挿入されたプラスミドを持つ形質転換株が得られた。これらのプラスミドを持つ形質転換株を増殖させ、常法によりプラスミドを精製した。これらのインサートDNAの塩基配列をタックダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングキット（パーキンエルマー社）を用いて決定した。用いたプライマーはT3, T7プライマー（ストラタジーン社）及びOCIFcDNAの塩基配列に基づいて設計された合成プライマーを用いた。オリジナルタイプのOCIF以外に、OCIFバリエントは全部で4種類（OCIF2, 3, 4, 5）存在した。決定されたOCIF2cDNAの塩基配列を配列番号8にその配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号9に示す。決定されたOCIF3 cDNAの塩基配列を配列番号10にその配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号11に示す。決定されたOCIF4 cDNAの塩基配列を配列番号12にその配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号13に示す。決定されたOCIF5 cDNAの塩基配列を配列番号14にその配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号15に示す。これらのOCIFバリエントの構造の特徴を、図9～12及び以下の記載をもって、簡単に説明する。

OCIF2

OCIFcDNAの塩基配列（配列番号6）の265番目のグアニンから285番目のグアニンまでの21bpの欠失があり、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列（配列表配列番号5）の68番目のグルタミン酸（Glu）から74番目のグルタミン（G

1 n) までの7アミノ酸の欠失がある。

OCIF3

OCIFcDNAの塩基配列(配列番号6)の9番目のシチジンがグアニンに変換して、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列(配列表配列番号5)の-19番目のアスパラギン(Asn)がリジン(Lys)に変わっている。但し、これはシグナル配列の中のアミノ酸置換であり、分泌されるOCIF3には影響しないと思われる。

OCIFcDNAの塩基配列(配列番号6)の872番目のグアニンから989番目のグアニンまでの117bpの欠失があり、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列(配列表配列番号5)の270番目のスレオニン(Thr)から308番目のロイシン(Leu)までの39アミノ酸の欠失がある。

OCIF4

OCIFcDNAの塩基配列(配列番号6)の9番目のシチジンがグアニンに変換して、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列(配列表配列番号5)の-19番目のアスパラギン(Asn)がリジン(Lys)に変わっている。又、22番目のグアニンがチミジンに変換して、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列(配列表配列番号5)の-14番目のアラニン(Ala)がセリン(Ser)に変わっている。但し、これらはシグナル配列の中のアミノ酸置換であり、分泌されるOCIF4には影響しないと思われる。

OCIFcDNAの塩基配列(配列番号6)の400番目と401番目の間に約4kbのイントロン2の挿入があり、オープンリーリングフレームがその中で止まる。アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列(配列表配列番号5)の112番目のアラニン(Ala)の後に21アミノ酸からなる新規なアミノ酸配列が付加されている。

OCIF5

OCIFcDNAの塩基配列(配列番号6)の9番目のシチジンがグアニンに変換して、アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列(配列表配列番号5)の-19番目のアスパラギン(Asn)がリジン(Lys)に変わっている。但し、これはシグナル配列の中のアミノ酸置換であり、分泌されるOCIF5には影響しない

と思われる。

OCIFcDNAの塩基配列（配列番号6）の400番目と401番目の間に約1.8 kbのイントロン2の後半部分の挿入があり、オープンリーリングフレームがその中で止まる。アミノ酸配列ではOCIFのアミノ酸配列（配列表配列番号5）の112番目のアラニン（A1a）の後に12アミノ酸からなる新規なアミノ酸配列が付加されている。

〔実施例21〕

OCIF類縁体（バリエント）の生産

i) OCIFバリエントcDNAの発現プラスミドの作製

実施例20で得られたOCIFバリエントcDNAのうち、OCIF2, 3のcDNAがそれぞれ挿入されたプラスミドpBKOCIF2、pBKOCIF3を制限酵素XhoI及びBamHI（宝酒造社）で消化し、OCIF2及び3のcDNAをそれぞれ切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX ゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。これらのOCIF2及び3のcDNAを、あらかじめ制限酵素XhoI及びBamHI（宝酒造社）で消化しておいた発現プラスミドpCEP4（インヴィトロジェン社）に、ライゲーションキット Ver.2（宝酒造社）を用いて挿入し、大腸菌DH5 α （ギブコBRL社）の形質転換を行った。

又、実施例20で得られたOCIFバリエントcDNAのうち、OCIF4のcDNAを挿入されたプラスミドpBKOCIF4を制限酵素SpeI及びXhoI（宝酒造社）で消化し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX ゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。このOCIF4のcDNAを、あらかじめ制限酵素NheI及びXhoI（宝酒造社）で消化しておいた発現プラスミドpCEP4（インヴィトロジェン社）に、ライゲーションキット Ver.2（宝酒造社）を用いて挿入し、大腸菌DH5 α （ギブコBRL社）の形質転換を行った。

又、実施例20で得られたOCIFバリエントcDNAのうち、OCIF5のcDNAを挿入されたプラスミドpBKOCIF5を制限酵素Hind III（宝酒造社）で消化し、OCIF5cDNAのコーディング領域の5'領域を切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX ゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精

製した。実施例13-i)で得られたOCIF発現プラスミドpCEPOCIFを制限酵素Hind III(宝酒造社)で消化し、OCIFcDNAのコーディング領域の5'領域を取り除き、pCEPプラスミドとOCIFcDNAの3'領域を含んだDNA断片pCEPOCIF-3'をアガロース電気泳動によって分離後、QIAEX ゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。このOCIF5 cDNAのHind III断片をpCEPOCIF-3'にライゲーションキット Ver.2(宝酒造社)を用いて挿入し、大腸菌DH5 α (ギブコBRL社)の形質転換を行った。

得られた形質転換株を増殖させ、OCIF2, 3, 4, 5のcDNAが挿入された発現プラスミドpCEPOCIF 2, 3, 4, 5を、キアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。OCIFバリエーション発現プラスミドをエタノールによって沈澱させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

ii) OCIFバリエーションcDNAのトランジェントな発現及びその活性の測定

実施例21-i)で得られたOCIFバリエーション発現プラスミドpCEPOCIF 2, 3, 4, 5を用いて、実施例13-ii)で述べた方法でOCIFバリエーションをトランジェントに発現させ、それらの活性を調べた。その結果、これらのOCIFバリエーションに弱い活性を認めた。

〔実施例22〕

OCIF変異体の作製

i) OCIF変異体cDNAサブクローニング用プラスミドベクターの作製

実施例11記載のプラスミドベクター5 μ gを、制限酵素BamHI及びXhoI(宝酒造社)で切断した。切断したDNAを調製用アガロースゲル電気泳動に供した。OCIFcDNA全長を含む約1.6キロベースペア(kb)のDNA断片を単離し、QIAEX ゲルエクストラクションキット(キアゲン社)により精製し、20 μ lの滅菌蒸留水に溶解したDNA溶液1を得た。次に、pBluescript IISK⁺(ストラタジーン社)3 μ gを制限酵素BamHI及びXhoI(宝酒造社)で切断した。切断したDNAを調製用アガロースゲル電気泳動に供した。約3.0 kbのDNA断片を単離し、QIAEX ゲルエクストラクションキット(キアゲン社)により精製し、20 μ lの滅菌蒸留水に溶解したDNA溶液2を得た。1 μ lのDNA溶液2と4

μ l の DNA 溶液 1 を混合し、5 μ l の DNA ライゲーションキット ver.2 I 液（宝酒造社）を添加し混合後、16℃で30分間保温し、ライゲーション反応を行った。尚、以下のライゲーション反応は全て16℃30分の保温条件で行った。

このライゲーション反応液を用い、以下の条件で大腸菌の形質転換を行った。尚、以後大腸菌の形質転換は以下の条件で行った。このライゲーション反応液 5 μ l と大腸菌 DH5 α コンピテント細胞（ギブコ BRL 社）100 μ l とを15ml用滅菌チューブ（岩城ガラス社）中で混合し、氷水中30分放置した。42℃45秒保温後、250 μ l の L 培地（1%トリプトン、0.5%イーストエキストラクト、1% NaCl）を添加し攪拌しながら37℃で培養した。50 μ l の菌液を50 μ g/ml アンピシリンを含む 2 ml の L 寒天培地上にスプレッドした。37℃で一晩培養し、生育してきたコロニー 6 種を 2 ml の L アンピシリン液体培地でさらに一晩培養し、各株が持つプラスミドの構造を調べた。pBluescript IISK⁺ の BamHI XhoI 切断部位に OCIFcDNA 全長を含む約 1.6kb の DNA 断片が挿入された構造を持つプラスミド（以後 pSK⁺-OCIF と呼ぶ）を得た。

ii) Cys を Ser に置換した変異体の作製

(1) 変異の導入

配列表配列番号 4 に記載のアミノ酸配列中、174, 181, 256, 298 及び 379 番の Cys 残基を Ser 残基に置換した変異体を作製した。174Cys を Ser に置換した変異体を OCIF-C19S、181Cys を Ser に置換した変異体を OCIF-C20S、256Cys を Ser に置換した変異体を OCIF-C21S、298Cys を Ser に置換した変異体を OCIF-C22S、379 Cys を Ser に置換した変異体を OCIF-C23S2 と、それぞれ名付けた。変異体作製のためにまず、各 Cys 残基をコードする塩基配列を Ser 残基をコードする塩基配列に置換した。変異導入は二段階の PCR (polymerase chain reaction) により行った。以後、二段階 PCR 反応と呼ぶ。第一段階は 2 つの PCR 反応より成る (PCR 1 及び PCR 2)。

P C R 1 反 応 液

10X Ex Taq バッファー (宝酒造社)	1 0	μ l
2.5 mM dNTP 溶液	8	μ l
実施例 1 1 記載のプラスミドベクター (8ng/ml)	2	μ l
滅菌蒸留水	7 3 . 5	μ l
2 0 μ M プライマー 1	5	μ l
1 0 0 μ M プライマー 2 (変異導入用)	1	μ l
Ex Taq (宝酒造社)	0 . 5	μ l

P C R 2 反 応 液

10X Ex Taq バッファー (宝酒造社)	1 0	μ l
2.5 mM dNTP 溶液	8	μ l
実施例 1 1 記載のプラスミドベクター (8ng/ml)	2	μ l
滅菌蒸留水	7 3 . 5	μ l
2 0 μ M プライマー 3	5	μ l
1 0 0 μ M プライマー 4 (変異導入用)	1	μ l
Ex Taq (宝酒造社)	0 . 5	μ l

各変異導入時には、プライマーの種類だけを変え、他の反応組成は同一とした。各反応で用いたプライマーを表10に、その配列を配列表配列番号20、23、27、30～40に示す。P C R 1 反応液及びP C R 2 反応液をそれぞれ別の微量遠心チューブに入れ混合後、以下の条件でP C Rを行った。97℃で3分処理後、95℃1分、55℃1分、72℃3分の3段階の反応を25回繰り返したのち、70℃5分保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動に供し、目的の長さのDNA断片が合成されていることを確認した。第一段階P C R反応終了後、アミコンマイクロコン (アミコン社) により反応液からプライマーを除去し、滅菌蒸留水により最終液量を50 μ l に調製し、得られたDNA断片を用いさらに第2段階P C R反応 (P C R 3) を行った。

PCR 3 反応液

10X Ex Taq バッファー (宝酒造社)	1.0	μ l
2.5 mM dNTP 溶液	8	μ l
PCR 1 により得られた DNA 断片	5	μ l
PCR 2 により得られた DNA 断片	5	μ l
滅菌蒸留水	61.5	μ l
20 μ M プライマー 1	5	μ l
20 μ M プライマー 3	5	μ l
Ex Taq (宝酒造社)	0.5	μ l

第 10 表

変異体名	プライマー-1	プライマー-2	プライマー-3	プライマー-4
OCIF-C19S	IF 10	C19SR	IF 3	C19SF
OCIF-C20S	IF 10	C20SR	IF 3	C20SF
OCIF-C21S	IF 10	C21SR	IF 3	C21SF
OCIF-C22S	IF 10	C22SR	IF 14	C22SF
OCIF-C23S	IF 6	C23SR	IF 14	C23SF

上記の溶液を微量遠心チューブに入れ混合後、PCR 1、PCR 2 と同一の条件で PCR を行った。反応液の一部をアガロース (1% 或いは 1.5%) 電気泳動に供し、目的の長さの DNA 断片が合成されていることを確認した。PCR により得られた DNA をエタノールにより沈殿させ、真空中で乾燥させ、40 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。C19S 変異 DNA 断片を含む溶液を溶液 A、C20S 変異 DNA 断片を含む溶液を溶液 B、C21S 変異 DNA 断片を含む溶液を溶液 C、C22S 変異 DNA 断片を含む溶液を溶液 D、C23S 変異 DNA 断片を含む溶液を溶液 E と名付けた。

溶液 A 20 μ l 中の DNA 断片を制限酵素 NdeI 及び SphI (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 400bp の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の蒸留

水に溶解した (DNA 溶液 3)。次に、 $2\ \mu\text{g}$ の pSK + -OCIF を制限酵素 NdeI 及び SphI (宝酒造社) により切断し、調製用電気泳動により約 4.2kb の DNA 断片を分離・精製し $20\ \mu\text{l}$ の滅菌蒸留水に溶解した (DNA 溶液 4)。 $2\ \mu\text{l}$ の DNA 溶液 3 と $3\ \mu\text{l}$ の DNA 溶液 4 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver.2 I 液 $5\ \mu\text{l}$ を添加しライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 $5\ \mu\text{l}$ を用い、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA 構造の解析により目的のプラスミド DNA を持つ株を選びだした。DNA 構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミド DNA を pSK-OCIF-C19S と名付けた。

溶液 B $20\ \mu\text{l}$ 中の C20S 変異 DNA 断片を制限酵素 NdeI 及び SphI (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 400bp の DNA 断片を分離・精製し $20\ \mu\text{l}$ の蒸留水に溶解した (DNA 溶液 5)。 $2\ \mu\text{l}$ の DNA 溶液 5 と $3\ \mu\text{l}$ の DNA 溶液 4 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver.2 I 液 $5\ \mu\text{l}$ を添加しライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 $5\ \mu\text{l}$ を用い、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA 構造の解析により目的のプラスミド DNA を持つ株を選びだした。DNA 構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミド DNA を pSK-OCIF-C20S と名付けた。

溶液 C $20\ \mu\text{l}$ 中の DNA 断片を制限酵素 NdeI 及び SphI (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 400bp の DNA 断片を分離・精製し $20\ \mu\text{l}$ の蒸留水に溶解した (DNA 溶液 6)。 $2\ \mu\text{l}$ の DNA 溶液 6 と $3\ \mu\text{l}$ の DNA 溶液 4 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver.2 I 液 $5\ \mu\text{l}$ を添加しライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 $5\ \mu\text{l}$ を用い、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA 構造の解析により目的のプラスミド DNA を持つ株を選びだした。DNA 構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミド DNA を pSK-OCIF-C21S と名付けた。

溶液 D 20 μ l 中の DNA 断片を制限酵素 NdeI 及び BstPI (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 600bp の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の蒸留水に溶解した (DNA 溶液 7)。次に、2 μ g の pSK + -OCIF を制限酵素 NdeI 及び BstPI (宝酒造社) により切断し、調製用電気泳動により約 4.0kb の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の蒸留水に溶解した (DNA 溶液 8)。2 μ l の DNA 溶液 7 と 3 μ l の DNA 溶液 8 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver.2 I 液 5 μ l を添加しライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 5 μ l を用い、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA 構造の解析により目的のプラスミド DNA を持つ株を選びだした。DNA 構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミド DNA を pSK-OCIF-C22S と名付けた。

溶液 E 20 μ l 中の DNA 断片を制限酵素 BstPI 及び EcoRV (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 120bp の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した (DNA 溶液 9)。次に、2 μ g の pSK + -OCIF を制限酵素 BstEII 及び EcoRV (宝酒造社) により切断し、調製用電気泳動により約 4.5kb の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の蒸留水に溶解した (DNA 溶液 10)。2 μ l の DNA 溶液 9 と 3 μ l の DNA 溶液 10 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver.2 I 液 5 μ l を添加しライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 5 μ l を用い、大腸菌 DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA 構造の解析により目的のプラスミド DNA を持つ株を選びだした。DNA 構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミド DNA を pSK-OCIF-C23S と名付けた。

(2) 変異体発現ベクターの構築

得られた目的のプラスミド DNA (pSK-OCIF-C19S, pSK-OCIF-C20S pSK-OCIF-C21S, pSK-OCIF-C22S, pSK-OCIF-C23S) を制限酵素 BamHI 及び XhoI (宝酒造社) で切断し、OCIFcDNA 全長を含む約 1.6kb の DNA 断片 (目的の変異も含む) を分離・

精製し、滅菌蒸留水 20 μ l に溶解した。それぞれ C19SDNA 溶液、C20SDNA 溶液、C21SDNA 溶液、C22SDNA 溶液、C23SDNA 溶液と名付けた。次に、発現ベクター pCEP4 (インヴィトロジェン社) 5 μ g を制限酵素 BamHI 及び XhoI (宝酒造社) で切断し、約 10 kb の DNA を分離・精製し滅菌蒸留水 40 μ l に溶解した (pCEP4DNA 溶液)。pCEP4DNA 溶液 1 μ l と各 6 μ l の C19SDNA 溶液、C20SDNA 溶液、C21SDNA 溶液、C22SDNA 溶液、C23SDNA 溶液を別々に混合し、各混合液に 7 μ l の DNA ライゲーションキット Ver.2 I 液を添加し、ライゲーション反応を行った。反応終了後、7 μ l の反応液を用い、大腸菌 DH5 α コンピテント細胞液 100ml を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、pCEP4 の XhoI、BamHI 部位に約 1.6kb の各 DNA 断片が挿入された目的の構造のプラスミド DNA を持つ株計 5 種を選びだし、それぞれ、pCEP4-OCIF-C19S, pCEP4-OCIF-C20S, pCEP4-OCIF-C21S, pCEP4-OCIF-C22S, pCEP4-OCIF-C23S と名付けた。

ii) ドメイン欠失変異体の作製

(1) ドメイン欠失変異の導入

配列番号 4 に記載したアミノ酸中、2 番の Thr から 42 番の Ala まで、43 番の Pro から 84 番の Cys まで、85 番の Glu から 122 番の Lys まで、123 番の Arg から 164 番の Cys まで、177 番の Asp から 251 番の Gln まで、253 番の Ile から 326 番の His までを、それぞれ欠失させた変異体を作製した。2 番の Thr から 42 番の Ala までを欠失させた変異体を OCIF-DCR1、43 番の Pro から 84 番の Cys までを欠失させた変異体を OCIF-DCR2、85 番の Glu から 122 番の Lys までを欠失させた変異体を OCIF-DCR3、123 番の Arg から 164 番の Cys までを欠失させた変異体を OCIF-DCR4、177 番の Asp から 251 番の Gln までを欠失させた変異体を OCIF-DDD1、253 番 Ile から 326 番の His までを欠失させた変異体を OCIF-DDD2 と、それぞれ名付けた。ドメイン欠失変異の導入も、実施例 22-ii) に記載の二段階 PCR 法によって行った。各変異導入反応時に用いたプライマーを表 11 に、その配列を配列表配列番号 19、25、40~53、及び 54 に示す。

第 1 1 表

変異体名	プライマー1	プライマー2	プライマー3	プライマー4
OCIF-DCR1	XhoI F	DCR1R	IF 2	DCR1F
OCIF-DCR2	XhoI F	DCR2R	IF 2	DCR2F
OCIF-DCR3	XhoI F	DCR3R	IF 2	DCR3F
OCIF-DCR4	XhoI F	DCR4R	IF 16	DCR4F
OCIF-DDD1	IF 8	DDD1R	IF 14	DDD1F
OCIF-DDD2	IF 8	DDD2R	IF 14	DDD2F

P C Rにより得られたDNAをエタノールにより沈殿させ真空中で乾燥させ、40 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。DCR1変異DNA断片を含む溶液を溶液F、DCR2変異DNA断片を含む溶液を溶液G、DCR3変異DNA断片を含む溶液を溶液H、DCR4変異DNA断片を含む溶液を溶液I、DDD1変異DNA断片を含む溶液を溶液J、DDD2変異DNA断片を含む溶液を溶液Kと名付けた。

溶液F 20 μ l 中のDNA断片を制限酵素NdeI及びXhoI（宝酒造社）により切断した。調製用電気泳動により約500bp のDNA断片を分離・精製し20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した（DNA溶液11）。次に、2 μ g のpSK + -OCIF を制限酵素NdeI及びXhoI（宝酒造社）により切断し、調製用電気泳動により約4.0kb のDNA断片を分離・精製し20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した（DNA溶液12）。2 μ l のDNA溶液11と3 μ l のDNA溶液12を混合し、さらにDNAライゲーションキットver.2 I液5 μ l を添加しライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液5 μ l を用い、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA構造の解析により、OCIFcDNAに目的の変異の導入されたプラスミドDNAを持つ株を選びだした。DNA構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミドDNAをpSK-OCIF-DCR1 と名付けた。溶液G 20 μ l 中のDNA断片を制限酵素NdeI及びXhoI（宝酒造社）により切断した。調製用電気泳動により約500bp のDNA断片を分離・精製し20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した（DNA溶液13）。2 μ l のDNA溶液13と3 μ l のDNA溶液12を混合し、さらにD

NAライゲーションキットver.2 I液を5 μ l 添加し、ライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液5 μ l を用い、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA構造の解析により目的のプラスミドDNAを持つ株を選びだした。DNA構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミドDNAをpSK-OCIF-DCR2 と名付けた。

溶液H 20 μ l 中のDNA断片を制限酵素NdeI及びXhoI（宝酒造社）により切断した。調製用電気泳動により約500bp のDNA断片を分離・精製し20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した（DNA溶液14）。2 μ l のDNA溶液14と3 μ l のDNA溶液12を混合し、さらにDNAライゲーションキットver.2 I液を5 μ l 添加し、ライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液5 μ l を用い、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA構造の解析により、OCIF c DNAに目的の変異の導入されたプラスミドDNAを持つ株を選びだした。DNA構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミドDNAをpSK-OCIF-DCR3 と名付けた。

溶液I 20 μ l 中のDNA断片を制限酵素XhoI及びSphI（宝酒造社）により切断した。調製用電気泳動により約900bp のDNA断片を分離・精製し20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した（DNA溶液15）。次に、2 μ g のpSK + -OCIF を制限酵素XhoI及びSphI（宝酒造社）により切断し、調製用電気泳動により約3.6kb のDNA断片を分離・精製し20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した（DNA溶液16）。2 μ l のDNA溶液15と3 μ l のDNA溶液16を混合し、さらにDNAライゲーションキットver.2 I液5 μ l を添加し、ライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液5 μ l を用い、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA構造の解析により目的のプラスミドDNAを持つ株を選びだした。DNA構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミドDNAをpSK-OCIF-DCR4 と名付けた。

溶液 J 20 μ l 中の DNA 断片を制限酵素 BstPI 及び NdeI (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 400bp の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した (DNA 溶液 17)。2 μ l の DNA 溶液 17 と 3 μ l の DNA 溶液 8 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver. 2 I 液を 5 μ l 添加し、ライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 5 μ l を用い、大腸菌 DH 5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA 構造の解析により目的のプラスミド DNA を持つ株を選びだした。DNA 構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミド DNA を pSK-OCIF-DDD1 と名付けた。

溶液 K 20 μ l 中の DNA 断片を制限酵素 BstPI 及び NdeI (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 400bp の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した (DNA 溶液 18)。2 μ l の DNA 溶液 18 と 3 μ l の DNA 溶液 8 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver. 2 I 液を 5 μ l 添加し、ライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 5 μ l を用い、大腸菌 DH 5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA 構造の解析により目的のプラスミド DNA を持つ株を選びだした。DNA 構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミド DNA を pSK-OCIF-DDD2 と名付けた。

(2) 変異体発現ベクターの構築

得られた目的のプラスミド DNA (pSK-OCIF-DCR1, pSK-OCIF-DCR2, pSK-OCIF-XR3, pSK-OCIF-DCR4, pSK-OCIF-DDD1, pSK-OCIF-DDD2) を制限酵素 BamHI 及び XhoI (宝酒造社) で切断し OCIFcDNA 全長を含む約 1.4-1.5 kb の DNA 断片 (目的の変異も含む) を分離・精製し、滅菌蒸留水 20 μ l に溶解した。それぞれを DCR1DNA 溶液、DCR2DNA 溶液、DCR3DNA 溶液、DCR4DNA 溶液、DDD1DNA 溶液、DDD2DNA 溶液と名付けた。実施例 22-ii) に記載の pCEP4 DNA 溶液 1 μ l と各 6 μ l の DCR1 DNA 溶液、DCR2DNA 溶液、DCR3DNA 溶液、DCR4DNA 溶液、DDD1DNA 溶液、DDD2DNA 溶液を別々に混合し、各混合液に 7 μ l の DNA ライゲーションバッファーを添加し、ライゲーション反応を行った。反応終了後、7 μ l の反応液を用い、大腸

菌 D H 5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から pCEP4 BamHI XhoI 部位に各 1.4-1.5kb 断片が挿入された構造のプラスミド DNA を持つ株計 6 種を選びだした。目的の構造を持つプラスミドをそれぞれ pCEP4-OCIF-DCR1、pCEP4-OCIF-DCR2、pCEP4-OCIF-DCR3、pCEP4-OCIF-DCR4、pCEP4-OCIF-DDD1、pCEP4-OCIF-DDD2 と名付けた。

iii) C 末端ドメイン欠失変異体の作製

(1) C 末端ドメイン欠失変異の導入

配列番号 4 に記載したアミノ酸中、379 番の Cys と 380 番の Leu、331 番の Ser から 380 番の Leu まで、252 番の Asp から 380 番の Leu まで、177 番の Asp から 380 番の Leu まで、123 番の Arg から 380 番の Leu まで、86 番の Cys から 380 番の Leu までを、それぞれ欠失させた変異体を作製した。379 番の Cys と 380 番の Leu を欠失させた変異体を OCIF-CL、331 番の Ser から 380 番の Leu までを欠失させた変異体を OCIF-CC、252 番の Asp から 380 番の Leu までを欠失させた変異体を OCIF-CDD2、177 番の Asp から 380 番の Leu までを欠失させた変異体を OCIF-CDD1、123 番の Arg から 380 番の Leu までを欠失させた変異体を OCIF-CCR4、86 番の Cys から 380 番の Leu までを欠失させた変異体を OCIF-CCR3 と、それぞれ名付けた。

変異体 OCIF-CL の作製用の変異導入は、実施例 22-ii) に記載の二段階 PCR 法によって行った。変異導入反応時に用いたプライマーを表 12 に、その塩基配列を配列表配列番号 23、40、55 及び 56 に示す。PCR により得られた DNA をエタノールにより沈殿させ、真空中で乾燥させ、40 μ l の滅菌蒸留水に溶解した (溶液 L)。

溶液 L 20 μ l 中の DNA 断片を制限酵素 BstPI 及び EcoRV (宝酒造社) により切断した。調製用電気泳動により約 100bp の DNA 断片を分離・精製し 20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した (DNA 溶液 19)。次に、2 μ l の DNA 溶液 9 と 3 μ l の実施例 22-ii) 記載の DNA 溶液 10 を混合し、さらに DNA ライゲーションキット ver.2 I 液を 5 μ l 添加し、ライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液 5 μ l を用い、大腸菌 D H 5 α を形質転換した。得られたアンピシ

リン耐性形質転換細胞から、DNA構造の解析により目的のプラスミドDNAを持つ株を選びだした。DNA構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミドDNAをpSK-OCIF-CLと名付けた。変異体OCIF-CC、変異体OCIF-CDD2、変異体OCIF-CDD1、変異体をOCIF-CCR4、変異体OCIF-CCR3 作製用の変異導入には、一段階のPCR法を用いた。以下に反応条件を示す。

C末端ドメイン欠失変異導入用PCR 反応液

10X Ex Taq バッファー (宝酒造社)	10	μ l
2.5 mM dNTP 溶液	8	μ l
実施例11記載のプラスミドベクター (8ng/ml)	2	μ l
滅菌蒸留水	73.5	μ l
20 μ M プライマー OCIF Xho F	5	μ l
100 μ M 変異導入用プライマー	1	μ l
Ex Taq (宝酒造社)	0.5	μ l

第12表

変異体名	プライマー-1	プライマー-2	プライマー-3	プライマー-4
OCIF-CL	IF 6	CL R	IF 14	CL F

各変異導入時には、プライマーの種類だけを変え、他の反応組成は同一とした。各反応での変異導入用プライマーを表13に、その配列を配列表配列番号57～61に示す。PCR反応液を微量遠心チューブに入れ混合後、以下の条件でPCRを行った。97℃で3分処理後、95℃30秒、50℃30秒、70℃3分の3段階の反応を25回繰り返したのち、70℃5分保温した。反応液の一部をアガロース電気泳動に供し、目的の長さのDNA断片が合成されていることを確認した。反応液からアミコン・マイクロコンによりプライマーを除去し、DNAをエタノールにより沈殿させ

真空中で乾燥させ、40 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。各変異DNA断片を含む溶液20 μ l 中のDNA断片を制限酵素XhoI及びBamHIによりDNAを切断した。酵素切断終了後、DNAをエタノールにより沈殿させ真空中で乾燥させ、20 μ l の滅菌蒸留水に溶解した。溶液をそれぞれCCDNA 溶液、CDD2DNA 溶液、CDD1DNA 溶液、CCR4DNA 溶液、CCR3DNA 溶液と名付けた。

第13表

変異体名	変異導入用プライマー
OCIF-CC	CC R
OCIF-CDD2	CDD2 R
OCIF-CDD1	CDD1 R
OCIF-CCR4	CCR4 R
OCIF-CCR3	CCR3 R

(2) 変異体発現ベクターの構築

pSK-OCIF-CL を制限酵素BamHI 及びXhoI (宝酒造社) で切断し、OCIFcDNAを含む約1.5 kbのDNA断片 (目的の変異も含む) を分離・精製し、滅菌蒸留水20 μ l に溶解した (CLDNA 溶液)。実施例22-ii) に記載のpCEP4 DNA 溶液1 μ l と各6 μ l のCLDNA 溶液、CCDNA 溶液、CDD2DNA 溶液、CDD1DNA 溶液、CCR4DNA 溶液、CCR3DNA 溶液を別々に混合し、7 μ l のDNAライゲーションキット Ver.2 I液を添加し、ライゲーション反応を行った。反応終了後、7 μ l の反応液を用い、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から目的の変異を持つOCIFcDNA断片がpCEP4 のXhoI-BamHI部位に挿入された構造のプラスミドDNAを持つ株計6種を選びだした。目的の構造を持つプラスミドをそれぞれ、pCEP4-OCIF-CL, pCEP4-OCIF-CC, pCEP4-OCIF-CDD2, pCEP4-OCIF-CDD1, pCEP4-OCIF-CCR4, pCEP4-OCIF-CCR3と名付けた。

iv) C末端欠失変異体の作製

(1) C末端欠失変異の導入

配列番号4に記載したアミノ酸中、371番Glnから380番Leuまでを欠失させLeu-Valの2残基を付加した変異体(OCIF-CBst)、298番Cysから380番Leuまでを欠失させSer-Leu-Aspの残基を付加した変異体(OCIF-CSph)、167番Asnから380番Leuまでを欠失させた変異体(OCIF-CBsp)、62番Cysから380番Leuまでを欠失させLeu-Valの2残基を付加した変異体(OCIF-CPst)を作製した。各2 μ gのpSK⁺-OCIFを制限酵素BstPI、SphI、PstI(宝酒造社)、及びBspEI(ニューイングランドバイオラボ社)で切断し、フェノール処理、エタノール沈殿によりDNAを精製し、10 μ lの滅菌蒸留水に溶解した。各2 μ lの溶液を用いDNAブランチングキット(宝酒造社)により各DNAの末端を平滑化した(最終容量5 μ l)。この反応液に、アンバーコドンを含むXbaIリンカー(5'-CTAGTCTAGACTAG-3')1 μ g(1 μ l)と、6 μ lのDNAライゲーションキットver.2 I液を添加し、ライゲーション反応を行った。反応後のライゲーション溶液6 μ lを用い、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から、DNA構造の解析により目的のプラスミドDNAを持つ株を選びだした。DNA構造は、制限酵素切断により得られる断片の長さの測定及び塩基配列の決定により解析した。得られた目的のプラスミドDNAをpSK-OCIF-CBst、pSK-OCIF-CSph、pSK-OCIF-CBsp、pSK-OCIF-CPstと名付けた。

(2) 変異体発現ベクターの構築

得られたプラスミドDNA(pSK-OCIF-CBst、pSK-OCIF-CSph、pSK-OCIF-CBsp、pSK-OCIF-CPst)を制限酵素BamHI及びXhoI(宝酒造社)で切断し、OCIFcDNA全長を含む約1.5キロベースペア(kb)のDNA断片(目的の変異も含む)を分離・精製し、滅菌蒸留水20 μ lに溶解した(それぞれCBstDNA溶液、CSphDNA溶液、CBspDNA溶液、CPstDNA溶液と名付けた)。実施例22-ii)に記載のpCEP4 DNA溶液1 μ lと各6 μ lのCBstDNA溶液、CSphDNA溶液、CBspDNA溶液、CPstDNA溶液を別々に混合し、各混合液に7 μ lのDNAライゲーションキットVer.2 I液を添加し、ライゲーション反応を行った。反応終了後、7 μ lの反応液を用い、大腸菌DH5 α を形質転換した。得られたアンピシリン耐性形質転換細胞から目的の変異を持つOCIFcDNA断片がpCEP4のXhoI BamHI部位間に挿入された構造のプ

ラスミドDNAを持つ株計5種を選びだした。目的の構造を持つプラスミドをそれぞれ、pCEP4-OCIF-CBst, pCEP4-OCIF-CSph, pCEP4-OCIF-CBsp, pCEP4-OCIF-CPstと名付けた。

v) 変異体発現ベクターの調製

変異体発現ベクターを持つ大腸菌(計21種類)を増殖させ、各種変異体発現ベクターをキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。各発現ベクターはエタノールによって沈殿させた後、滅菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

vi) 変異体cDNAのトランジェントな発現及びその活性の測定

実施例22-v)で精製した各種OCIF変異体発現プラスミドを用い、実施例13の方法に従いOCIF変異体を発現させた。以下に変更した点のみを記する。DNA導入には24ウェルプレートを用いた。 2×10^5 個の293/EBNA細胞を10%牛胎児血清を含むIMDM培地を用いて各ウェルに植え込んだ。DNA導入の際用いた変異体発現ベクターとリポフェクタミンの量は、それぞれ $1 \mu\text{g}$ 及び $4 \mu\text{l}$ であった。OPTI-MEM培地(ギブコBRL社)で希釈し最終容量を0.5mlとした。変異体発現ベクターとリポフェクタミンの混合液を細胞に添加し、24時間37℃でCO₂インキュベーター中で培養した後混合液を除去し、0.5mlのEx-cell 301培地(JSR社)を加え、さらに48時間37℃でCO₂インキュベーター中で培養した。培地を回収し、これを変異体活性測定用サンプルとした。得られた各変異体の塩基配列を配列表配列番号83~103に、その配列から推定されるアミノ酸配列を配列表配列番号62~82に、それぞれ示す。OCIFの活性測定は実施例13に従った。また、実施例24に記載のEIA法により、OCIFの抗原量を定量した。表14に未改変OCIFと比較した抗原量当たりの活性を示す。

第 1 4 表

変異体の名称	活性
未改変OCIF	++
OCIF-C19S	+
OCIF-C20S	±
OCIF-C21S	±
OCIF-C22S	+
OCIF-C23S	++
OCIF-DCR1	±
OCIF-DCR2	±
OCIF-DCR3	±
OCIF-DCR4	±
OCIF-DDD1	+
OCIF-DDD2	±
OCIF-CL	++
OCIF-CC	++
OCIF-CDD2	++
OCIF-CDD1	+
OCIF-CCR4	±
OCIF-CCR3	±
OCIF-CBst	++
OCIF-CSph	++
OCIF-CBsp	±
OCIF-CPst	±

(表中、++は抗原量当たりの活性が未改変OCIFの活性の50%を超える、+は10%~50%、±は10%未満又は抗原量が正確に測定できないことをそれぞれ示す)

vi) ウェスタンブロッティング解析

活性測定に用いたサンプルの10 μ l をウェスタンブロット解析に供した。サンプル10 μ l に10 μ l のSDS-PAGE用サンプルバッファー(0.5M Tris-HCl、20%グリセロール、4%SDS、20 μ g/mlブロムフェノールブルー(pH 6.8))を加え、100 $^{\circ}$ Cで3分煮沸し非還元状態で10%SDSポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動終了後、セミドライブロッティング装置(バイオラッド社)によりPVDFメンブレン(ProBlott[®]、パーキンエルマー社)に蛋白質をブロッキングした。そのメンブレンをブロッキング後、実施例24に記載のEIA用西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体とともに、37 $^{\circ}$ Cで2時間保温した。洗浄後ECLシステム(アマシャム社)により抗OCIF抗体に結合する蛋白質を検出した。OCIFでは、約120 キロダルトン(kD)及び60kDのバンドが検出された。一方、OCIF-C23S、OCIF-CL、OCIF-CCでは、ほとんど60kDのバンドのみが検出された。また、OCIF-CDD2 及びOCIF-CDD1 ではそれぞれ約40-50 kD 及び30-40 kD のバンドが主要なバンドとして検出された。以上の結果より、OCIFでは、配列表配列番号4のアミノ酸配列にける380番目のCys残基が二量体形成に係わっていること、単量体でも活性を保持していること、及び177番Aspから380番Leuまでの残基を欠失させても活性を保持していることが明らかとなった。

〔実施例23〕

ヒトOCIFゲノムDNAの分離

I) ヒトゲノムDNAライブラリーのスクリーニング

ヒト肺の染色体DNAと λ FIX IIベクターを用いて作製されたゲノム・ライブラリーをストラタジーン社から購入し、これをOCIFcDNAをプローブとしてスクリーニングした。スクリーニングは、基本的にはゲノム・ライブラリーに添付されているプロトコールに従って実施したが、ファージ、大腸菌、DNAを扱う一般的方法はMolecular Cloning: A Laboratory Manual に従って行った。

購入したゲノムDNAライブラリーのタイターを検定したのち、 1×10^6 pfuのファージを大腸菌XL1-Blue MRAに感染させ、20枚のプレート(9 \times 13cm)にプレ

ート当たり 9 ml のトップ・アガロースとともに蒔いた。プレートを一夜 37℃ でインキュベートしたのち、Hybond-N ナイロン膜（アマシャム社）をアガープレート上に乗せてファージを転写した。ファージの転写したナイロン膜を 1.5M NaCl/0.5M NaOH 溶液で湿らせた濾紙上に 1 分間乗せ、その後 1M Tris-HCl, (pH7.5) と 1.5M NaCl/0.5M Tris-HCl (pH7.5) でそれぞれ 1 分ずつ処理して中和したのち、最後に 2 XSSC で湿らせた濾紙の上に移した。その後、このナイロン膜にストラリンカー（ストラタジーン社）を用いて 1200 マイクロジュールの UV を照射することによってファージ DNA を膜に固定した。次に、このナイロン膜をラピッドハイブリダイゼーション・バッファー（アマシャム社）に浸漬してプレハイブリダイゼーションを行った。1 時間のプレハイブリダイゼーションの後、³²P 標識した OCIFcDNA を加え、65℃ にて一夜ハイブリダイゼーションを行った。この cDNA プローブは、実施例 11 で得られた 1.6kb の OCIFcDNA を有するプラスミド pBKOCIF を、制限酵素 BamHI 及び XhoI とを用いて切断し、OCIFcDNA をアガロースゲル電気泳動によって単離したのち、この OCIFcDNA をメガプライム DNA ラベリングシステム（アマシャム社）を用いて ³²P で標識することによって作製した。標識は、ラベリングシステムに添付されたプロトコールに従って行った。ハイブリダイゼーションには、ハイブリダイゼーション・バッファー 1 ml 当たりおよそ 5×10^5 cpm のプローブを使用した。ハイブリダイゼーションの後、ナイロン膜を室温にて 2 XSSC で 5 分間洗浄し、その後 65℃ において 0.5 XSSC/0.1% SDS で 4 回、それぞれ 20 分ずつ洗浄した。4 回目の洗浄ののちナイロン膜を乾燥させ、富士フィルム社製 X 線フィルム、スーパー HR-H と増感スクリーンとを用いて -80℃ にてオートラジオグラフィーを行った。オートラジオグラム上に 6 個のシグナルが検出されたので、それぞれのシグナルに相当するアガープレート上の位置からトップ・アガロースを切り出し、1% のクロロホルムを添加した 0.5 ml の SM バッファーにそれぞれ浸漬して一夜放置し、ファージを抽出した。それぞれのファージ抽出液を SM バッファーで 1000 倍に希釈し、その中から 1 μ l と 20 μ l を取り、再び上記大腸菌に感染させ、トップ・アガロースとともに上記の方法でアガープレートに蒔いた。ファージをナイロン膜に転写後、上記の方法でプレハイブリダイ

ゼーション、ハイブリダイゼーション、洗浄、乾燥、オートラジオグラフィーを行った。このファージ純化の操作を当初オートラジオグラフィー上で検出された6個のシグナル全部について行い、アガープレート上のすべてのファージプラークがcDNAプローブとハイブリダイズするまで繰り返した。純化されたファージのプラークを切り出し、1%クロロホルムを含むSMバッファ0.5mlに浸漬し、4℃で保存した。こうして得られた6種の純化ファージを、それぞれλOIF3, λOIF8, λOIF9, λOIF11, λOIF12, λOIF17と名付けた。

II) 制限酵素消化及びサザンブロット・ハイブリダイゼーションによるヒトOCIFゲノムDNAクローンの分析

純化された6種のファージのDNAを、Molecular Cloning: A Laboratory Manual に書かれた方法に従ってプレートリシス法によって精製した。これらのDNAを制限酵素によって消化し、得られたフラグメントをアガロース電気泳動によって分離した。またアガロース・ゲルで分離されたフラグメントを、一般的な方法でナイロン膜に転移させたのち、OCIFcDNAをプローブとしてサザンブロット・ハイブリダイゼーションを行った。これらの分析の結果、それぞれ純化された6種のファージは異なったクローンであることが判明した。制限酵素消化によって得られたDNAフラグメントのうち、OCIFcDNAとハイブリダイズするものについては、プラスミドベクターにサブクローニングした後に下記の方法で塩基配列の分析を行った。

iii) ゲノムDNAクローンから制限酵素消化によって得られたDNAフラグメントのプラスミド・ベクターへのサブクローニングと塩基配列の決定

λOIF8 DNAを制限酵素EcoRI とNotIによって消化し、生じたフラグメントを0.7%アガロースゲルに供与して分離した。5.8kbのEcoRI/NotIフラグメントをQIAEX II Gel Extraction Kit(キアゲン社)を用いて添付されたプロトコールに従ってゲルから抽出した。このフラグメントを、前もってEcoRI とNotIによって切断しておいたpBluescriptII SK+ ベクター(ストラタジーン社)とReady-To-Go T4 Ligase(ファルマシア社)を用いて添付のプロトコールに従ってライゲーションした。得られたリコンビナント・プラスミドを、コンピテントDH5α大腸菌

(アマシャム社)に導入した後、50 μ g/mlのアンピシリンを含有するアガロースプレート上に蒔いてプラスミドを有する大腸菌を選択した。以上のようにして作製された5.8kb EcoRI/NotIフラグメント有するリコンビナント・プラスミドを、pBSG8-5.8 と命名した。次に、pBSG8-5.8 を制限酵素HindIII で消化して生ずる0.9 kbのDNAフラグメントをアガロースゲルで分離し、上記の方法にしたがって抽出した後、HindIII で前もって切断しておいたpBluescriptII SK-(ストラタジーン社)に挿入して、上記の方法に従ってクローニングした。この0.9kbのHindIII フラグメントを有するリコンビナント・プラスミドを、pBS8H0.9と命名した。一方、 λ 01F11のDNAをEcoRIを用いて消化して生ずる6 kb、3.6kb、及び2.6kbのフラグメントをそれぞれ単離したのち、上記と同様の方法に従ってpBluescript II SK+ベクターに挿入してクローニングした。こうして作製した6 kb、3.6 kb、及び2.6kb のEcoRI フラグメントを有するリコンビナント・プラスミドを、それぞれpBSG11-6、pBSG11-3.6、pBSG11-2.6と命名した。さらに、pBSG11-6を制限酵素HindIII によって消化することによって生ずる、2.2kb、1.1kb、1.05kbの3種のフラグメントをアガロースゲル電気泳動によって分離し、それぞれpBluescript II SK-のHindIII サイトに挿入してクローニングした。これら2.2kb、1.1kb、1.05 kb のHindIII フラグメントを有するリコンビナント・プラスミドを、それぞれpBS6H2.2、pBS6H1.1、pBS6H1.05 と命名した。ゲノムDNAの塩基配列の分析には、ABI Dyedexoxy Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (パーキンエルマー社)と373 DNA Sequencing System (アプライドバイオシステムズ社)を使用した。Molecular Cloning:A Laboratory Manual に書かれた方法に従ってpBSG8-5.8、pBS8H0.9、pBSG11-6、pBSG11-3.6、pBSG11-2.6、pBS6H2.2、pBS6H1.1、pBS6H1.05 を調製し、塩基配列決定用の鋳型として用いた。ヒトOCIFゲノムDNAの塩基配列を配列表配列番号104 及び105 に示す。エクソン1とエクソン2の間に介在する塩基の配列は必ずしも全部は決定されておらず、配列表配列番号104 及び105 に示された塩基配列の間に、およそ17kbのヌクレオチドが介在することが確認されている。

[実施例 24]

E I AによるO C I Fの定量

i) ウサギ抗O C I F抗体の調製

雄性日本白色ウサギ（体重2.5 ～3.0kg、北山ラベス社より入手）3羽に、r O C I F 200 μ g/mlをフロイント完全アジュバント(DIFCO社)と等量混合してエマルジョンとしたものを、1回1mlずつ皮下免疫した。免疫は1週間隔で合計6回行い、最終免疫後10日目に全採血を行った。分離した血清から抗体を以下の様に精製した。即ち、P B Sにて2倍希釈した抗血清に最終濃度40w/v %となるように硫酸アンモニウムを添加して4℃1時間放置後、8000×gで20分間遠心分離を行い、沈殿を得た。沈殿を少量のP B Sに溶解し、P B Sに対して4℃で透析した後、Protein G-Sepharose カラム（ファルマシア社）に負荷した。P B Sにて洗浄後、0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH3.0)にて吸着した免疫グロブリンGを溶出し、直ちに1.5 Mトリス塩酸緩衝液(pH8.7)で中性pHとした。溶出蛋白質画分をP B Sに対して透析後、280nmにおける吸光度を測定し、その濃度を決定した(E_{1%} 13.5)。西洋ワサビパーオキシダーゼ標識した抗O C I F抗体は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキット（ピアス社）を用いて作製した。即ち、1mgの精製抗体に80 μ gのN-スクシンイミド-S-アセチルチオ酢酸を添加し、室温で30分間反応させた。これに5mgのヒドロキシルアミンを添加して脱アセチル化した後、修飾された抗体をポリアクリルアミド脱塩カラムにて分画した。蛋白質画分を1mgのマレイミド活性化パーオキシダーゼと混合し、室温で1時間反応させ酵素標識抗体を得た。

ii) サンドイッチE I AによるO C I Fの定量

96ウェルのマイクロタイタープレート (MaxiSorp Immunoplate, Nunc社)の各ウェルに、100 μ lのウサギ抗O C I F抗体(2 μ g/ml、50mM 炭酸緩衝液(pH 9.6))を添加し4℃にて一晩静置して、抗体を固相化した。P B Sにて調製した25%ブロッカー（雪印乳業社）を300 μ lずつ各ウェルに添加し、37℃で1時間放置してブロッキングした後、検体(100 μ l/ウェル)を添加し室温で2時間反応させた。0.05% Tween20を含むP B S (PBST)にて3回洗浄した後、10000倍

希釈した西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体を100 μ lずつ添加し室温で2時間インキュベートした。PBSTにて3回洗浄した後、100 μ lの酵素基質溶液(TMB、ScyTek社)を加え室温で発色させた後、反応を停止した。

450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー(イムノリーダー NJ2000、日本インターメッド社)を用いて測定し、精製した組み換えOCIFを標準とした検量線から、検体のOCIF濃度を定量した。OCIFの検量線を図13に示す。

〔実施例25〕

抗OCIFモノクローナル抗体

i) ヒトOCIF抗体産生ハイブリドーマの調製

ヒト線維芽細胞IMR-90を培養し、その培養液から実施例11記載の方法でOCIFを精製した。精製OCIFを10 μ g/100 μ lの濃度になるようにPBSに溶解し、この溶液を2週間おきにBALB/cマウスに腹腔内投与し免疫した。初回及び2回目の免疫においては、等量のプロインド完全アジュバントの混合物を投与した。最終の免疫から3日目に脾臓を摘出し、Bリンパ球を分離し、マウスミエローマ細胞P3x63-AG8.653とを通常用いられているポリエチレングリコール法により細胞融合させた。ついで融合細胞を選択するためにHAT培地で培養を行うことにより、ハイブリドーマ細胞をセレクションした。次に、セレクションされた細胞がOCIF特異的抗体を産生しているか否かを確認するために、0.1M重曹溶液に溶解したOCIF溶液(10 μ g/ml)100 μ lを、96穴マイクロプレート(Nunc社)に加えて作製したソリッドフェーズELISAを用いて、ハイブリドーマ培養液中のOCIF特異的抗体の測定を行った。抗体生産が認められたハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングを3-5回繰り返し行い、その都度上記ELISAにより抗体産生量をチェックした。得られた抗体生産株の中から、抗体生産量の高いクローンを選別した。

ii) モノクローナル抗体の生産

実施例25-i)で得た抗体生産株を、それぞれ 1×10^6 を予めプリスタン(アルドリッチケミカル社)を接種しておいたBALB/c系マウスの腹腔内に移植した。移植2週間後、蓄積した腹水を採取し、本発明のモノクローナル抗体を含む

腹水を得た。この腹水より、アフィゲルプロテインAセファロース（バイオラッド社製）を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製抗体を得た。即ち、腹水を等量のバインディングバッファー（バイオラッド社）で希釈し、プロテインAカラムに負荷した後、充分量の同バッファーで洗浄した。IgGの溶出は、エリューションバッファー（バイオラッド社）で行った。得られた溶出液を水で透析した後、凍結乾燥を行った。得られた精製抗体をSDS-PAGEにより純度検定を行ったところ、分子量約150,000 の位置に均一なバンドを認めた。

iii) OCIFに対して高親和性を有するモノクローナル抗体の選択

実施例25-ii) で得た抗体をPBSに溶解し、ローリー法により蛋白定量を行った。ついで、各抗体を蛋白濃度が一定になるようにPBSに溶解し、この溶液を段階希釈法により希釈した。実施例25-ii) に記載のソリッドフェーズELISAを用いて、高い希釈段階までOCIFと反応するモノクローナル抗体を選別した。その結果、A1G5、E3H8、及びD2F4の3種の抗体が得られた。

iv) 抗体のサブクラスの検定

実施例25-iii) で選択した本発明の抗体のクラス及びサブクラスを、イムノグロブリンクラス及びサブクラス分析キット（アマシャム社）を用いて検定した。検定は、キットに指示されているプロトコールに従って実施した。結果を表15に示す。E3H8、A1G5、及びD2F4は、それぞれIgG₁、IgG_{2a}、及びIgG_{2b} であった。

第15表

抗体名	IgG ₁	IgG _{2a}	IgG _{2b}	IgG ₃	IgA	IgM	κ
A 1 G 5	—	+	—	—	—	—	+
E 3 H 8	+	—	—	—	—	—	+
D 2 F 4	—	—	+	—	—	—	+

v) OCIFのELISAによる測定方法

実施例25-iv) で得たA1G5、E3H8、及びD2F4の3種のモノクローナル抗体を、それぞれ固相抗体と標識抗体とした。それぞれの組み合わせにより、サンドイッチELISAを構築した。抗体の標識は、マレイミド活性化パーオキシダーゼキ

ット（ピアス社）を用いて行った。各々の抗体を $10\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように 0.1M 重曹溶液に溶解し、96穴イムノプレート（Nunc 社）の各ウエル当たり $100\mu\text{l}$ ずつそれぞれ分注し、室温で一晩放置した。次いで、各々のプレートを $1/2$ 濃度のブロックエース（雪印乳業社）でブロックし、 0.1% のTween20 を含むPBS（洗浄バッファー）で3回洗浄した。各濃度のOCIFを第一次反応バッファー（ $1/2.5$ 濃度のブロックエース及び 0.1% Tween20 を含む 0.2M トリス塩酸緩衝液、 $\text{pH } 7.4$ ）で調製した。調製した各濃度のOCIF溶液 $100\mu\text{l}$ ずつ各ウエルに加え、 37°C で3時間放置し、次いで洗浄バッファーで3回洗浄した。標識抗体の希釈には、第二次反応バッファー（ $1/4$ 濃度のブロックエース及び 0.1% の Tween 20を含む 0.1M トリス塩酸緩衝液、 $\text{pH } 7.4$ ）を用いた。各標識抗体を第2次反応バッファーで400 倍に希釈し、その各々 $100\mu\text{l}$ ずつを各ウエルにそれぞれ添加した。各々のプレートを 37°C で2時間放置し、次いで3回洗浄した後、基質溶液（ 0.4mg/ml のオルトフェニレンジアミン塩酸、 0.006% 過酸化水素を含む 0.1M クエン酸-リン酸バッファー、 $\text{pH } 4.5$ ） $100\mu\text{l}$ を各ウエルに添加した。 37°C で15分間暗室に放置した後、 6N 硫酸 $50\mu\text{l}$ を各ウエルに添加することにより酵素反応を停止させ、イムノリーダー（NJ2000, 日本インターメッド社）を用いて 492nm の吸光度を測定した。3種の抗体をそれぞれ固相抗体或いは標識抗体としたいずれの組み合わせにおいても良好な測定結果が得られ、3種の抗体はそれぞれOCIFの異なるエピトープを認識することを認めた。代表例として、A1G5を固相抗体としE3H8を標識抗体としたときの検量線を図14に示す。

vi) ヒト血清中のOCIFの測定

健常人5名の血清中のOCIFを実施例25-(v)の図14のELISA系で測定した。即ち、A1G5を実施例25-(v)と同様にイムノプレートに固相化し、各ウエルに第1次反応バッファーを $50\mu\text{l}$ 加え、次いで各ヒト血清 $50\mu\text{l}$ を加えて 37°C で3時間放置した。洗浄バッファーで3回洗浄した後、第2次反応バッファーで400 倍に希釈したE3H8の標識抗体 $100\mu\text{l}$ を各ウエルに加えて、 37°C で2時間放置した。プレートを洗浄バッファーで3回洗浄後、上記基質溶液 $100\mu\text{l}$ を各ウエルに添加し、 37°C で15分間反応させた。各ウエルに 6N 硫酸 $50\mu\text{l}$ ずつ添加し

て酵素反応を停止させ、イムノリーダーで492nmの吸光度を測定した。既知量のOCIFを含む第1次反応バッファーについても同様に操作し、図14に示すようなOCIFの検量線を作成し、血清試料の吸光度から血清中のOCIF量を求めた。結果を表16に示す。

第16表

血清サンプル	OCIF量 (ng/ml)
1	5.0
2	2.0
3	1.0
4	3.0
5	1.5

〔実施例26〕

骨粗鬆症に対する治療効果

神経切除による不動性の骨萎縮モデルに対するOCIFの治療効果を確認した。Fischer系雄ラットを用い、6週齢（体重約120g）で左上腕神経叢を切除することにより、左前肢の不動化を惹起して骨萎縮モデルを作成した。OCIFは0.01%Tween80を含むPBS（－）で調整し、翌日から5 μ g/kg及び50 μ g/kgの用量で12時間間隔で1日2回、2週間連日静脈内投与した。正常群には偽手術を施し、対照群には0.01%Tween80を含むPBS（－）を同様に投与した。投与終了後、左上腕を摘出し骨強度を測定した。結果を図15に示す。

この結果、正常群に比べ対照群では骨強度の低下が観察されたが、OCIF50 μ g/kg投与群において改善が認められた。

産業上の利用可能性

本発明により、新規な破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質及びその効率的な製造方法が提供される。本発明の蛋白質は破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症等各種の骨量減少性疾患の治療剤として或いはこれらの疾患の免疫学的診断の

ための抗原等として利用することができる。

寄託された微生物への言及

寄託機関の名称及びあて名

名 称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305）

寄託機関に寄託した日

平成7年6月21日（原寄託日）

（平成7年6月21日に寄託された微工研菌寄第P-14998号より移管、移管日

平成7年10月25日）

受託番号 F E R M BP-5267

配 列 表

配列番号： 1

配列の長さ： 6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド （蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Tyr His Phe Pro Lys

1

5

配列番号： 2

配列の長さ： 14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド （蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Gln His Ser Xaa Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Xaa Lys

1

5

10

配列番号： 3

配列の長さ： 12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド （蛋白質の内部アミノ酸）

配列：

Xaa Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys

1

5

10

配列番号：4

配列の長さ：380

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質（OCIF；シグナル無し）

配列：

Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His	Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser
1				5					10					15
His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys
				20					25					30
Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr	Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro
				35					40					45
Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His	Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu
				50					55					60
Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu	Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu
				65					70					75
Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys	Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg
				80					85					90
Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys	His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro
				95					100					105
Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val
				110					115					120
Cys	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser
				125					130					135
Lys	Ala	Pro	Cys	Arg	Lys	His	Thr	Asn	Cys	Ser	Val	Phe	Gly	Leu
				140					145					150
Leu	Leu	Thr	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	His	Asp	Asn	Ile	Cys	Ser
				155					160					165

Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu		
	170	175 180
Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr		
	185	190 195
Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys		
	200	205 210
Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser		
	215	220 225
Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn		
	230	235 240
Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu		
	245	250 255
Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr		
	260	265 270
Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys		
	275	280 285
Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro		
	290	295 300
Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn		
	305	310 315
Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His		
	320	325 330
Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys		
	335	340 345
Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr		
	350	355 360
Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val		
	365	370 375

Lys Ile Ser Cys Leu

380

配列番号 : 5

配列の長さ : 401

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (OCIF ; シグナル含む)

配列 :

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15					-10				
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					-1	1				5				
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60					65				
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75					80				
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85					90					95				
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr
100					105					110				

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320

Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

配列番号： 6

配列の長さ： 1 2 0 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 1

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： cDNA (OCIF)

配列：

```

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CAGGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660

```

AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
 AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
 AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
 GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
 AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
 CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
 ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080
 GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
 TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200
 TTATAA 1206

配列番号：7

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド（蛋白質のN末端アミノ酸）

配列：

Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His	Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser
1			5			10							15	

配列番号：8

配列の長さ：1185

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF.2)

配列：

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGTGC AATCGCACCC ACAACCGCGT GTGCGAATGC 300
 AAGGAAGGGC GCTACCTTGA GATAGAGTTC TGCTTGAAAC ATAGGAGCTG CCCTCCTGGA 360
 TTTGGAGTGG TGCAAGCTGG AACCCAGAG CGAAATACAG TTTGCAAAAG ATGTCCAGAT 420
 GGGTTCTTCT CAAATGAGAC GTCATCTAAA GCACCCTGTA GAAAACACAC AAATTGCAGT 480
 GTCTTTGGTC TCCTGCTAAC TCAGAAAGGA AATGCAACAC ACGACAACAT ATGTTCCGGA 540
 AACAGTGAAT CAACTCAAAA ATGTGGAATA GATGTTACCC TGTGTGAGGA GGCATTCTTC 600
 AGGTTTGCTG TTCCTACAAA GTTTACGCCT AACTGGCTTA GTGTCTTGGT AGACAATTG 660
 CCTGGCACCA AAGTAAACGC AGAGAGTGTA GAGAGGATAA AACGGCAACA CAGCTCACAA 720
 GAACAGACTT TCCAGCTGCT GAAGTTATGG AAACATCAAA ACAAAGACCA AGATATAGTC 780
 AAGAAGATCA TCCAAGATAT TGACCTCTGT GAAAACAGCG TGCAGCGGCA CATTGGACAT 840
 GCTAACCTCA CCTTCGAGCA GCTTCGTAGC TTGATGGAAA GCTTACCGGG AAAGAAAGTG 900
 GGAGCAGAAG ACATTGAAAA AACAATAAAG GCATGCAAAC CCAGTGACCA GATCCTGAAG 960
 CTGCTCAGTT TGTGGCGAAT AAAAAATGGC GACCAAGACA CCTTGAAGGG CCTAATGCAC 1020
 GCACTAAAGC ACTCAAAGAC GTACCACTTT CCCAAAAC TG TCACTCAGAG TCTAAAGAAG 1080
 ACCATCAGGT TCCTTCACAG CTTCACAATG TACAAATTGT ATCAGAAGTT ATTTT TAGAA 1140
 ATGATAGGTA ACCAGGTCCA ATCAGTAAAA ATAAGCTGCT TATAA 1185

配列番号： 9

配列の長さ： 3 9 4

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 蛋白質 (O C I F 2)

配列：

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20							-15					-10		
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5						1					5			
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Cys
55					60					65				
Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys	Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr
70					75					80				
Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys	His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly
85					90					95				
Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys
100					105					110				
Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys
115					120					125				
Ala	Pro	Cys	Arg	Lys	His	Thr	Asn	Cys	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Leu
130					135					140				
Leu	Thr	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	His	Asp	Asn	Ile	Cys	Ser	Gly
145					150					155				
Asn	Ser	Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Cys	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	Leu	Cys
160					165					170				
Glu	Glu	Ala	Phe	Phe	Arg	Phe	Ala	Val	Pro	Thr	Lys	Phe	Thr	Pro
175					180					185				

Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val		
190	195	200
Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln		
205	210	215
Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys		
220	225	230
Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys		
235	240	245
Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe		
250	255	260
Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val		
265	270	275
Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser		
280	285	290
Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly		
295	300	305
Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser		
310	315	320
Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys		
325	330	335
Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln		
340	345	350
Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys		
355	360	365
Ile Ser Cys Leu		
370		

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 1 0 8 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A (O C I F 3)

配列 :

```
ATGAACAAGT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC AGTTTGTGGC GAATAAAAAA TGGCGACCAA 900
GACACCTTGA AGGGCCTAAT GCACGCACTA AAGCACTCAA AGACGTACCA CTTTCCCAAA 960
ACTGTCACCTC AGAGTCTAAA GAAGACCATC AGGTTCTTTC ACAGCTTCAC AATGTACAAA 1020
TTGTATCAGA AGTTATTTTT AGAAATGATA GGTAACCAGG TCCAATCAGT AAAAATAAGC 1080
TGCTTATAA 1089
```

配列番号：11

配列の長さ：362

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質（OCIF3）

配列：

Met	Asn	Lys	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15						-10			
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					1						5			
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15						20			
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30						35			
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45						50			
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60						65			
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75						80			
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85					90						95			
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr
100					105						110			
Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe
115					120						125			

Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln		
265	270	275
Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr		
280	285	290
Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile		
295	300	305
Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu		
310	315	320
Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser		
325	330	335

Cys Leu

340

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 4 6 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF4)

配列 :

```
ATGAACAAGT TGCTGTGCTG CTCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GTACGTGTCA ATGTGCAGCA 420
AAATTAATTA GGATCATGCA AAGTCAGATA GTTGTGACAG TTTAG 465
```

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 1 5 4

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (OCIF4)

配列 :

Met	Asn	Lys	Leu	Leu	Cys	Cys	Ser	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20							-15						-10	
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5							1						5	
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10						15					20			
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25						30						35		
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40						45						50		
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55						60						65		
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70						75						80		
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85						90						95		
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr
100						105						110		
Cys	Gln	Cys	Ala	Ala	Lys	Leu	Ile	Arg	Ile	Met	Gln	Ser	Gln	Ile
115						120						125		
Val	Val	Thr	Val											
130														

配列番号：14

配列の長さ：438

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF5)

配列：

```
ATGAACAAGT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GATGCAGGAG AAGACCCAAG 420
CCACAGATAT GTATCTGA 438
```

配列番号：15

配列の長さ：140

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (OCIF5)

配列：

```
Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser
      -20          -15          -10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His
      -5          1          5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro
10          15          20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr
25          30          35
```

Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60					65				
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75					80				
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85					90					95				
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Cys
100					105					110				
Arg	Arg	Arg	Pro	Lys	Pro	Gln	Ile	Cys	Ile					
115					120					125				

配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーT3）

配列：

AATTAACCCT CACTAAAGGG

20

配列番号：17

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーT7）

配列：

GTAATACGAC TCACTATAGG GC

22

配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF1）

配列：

ACATCAAAAC AAAGACCAAG

20

配列番号：19

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF2）

配列：

TCTTGGTCTT TGTTTGTATG

20

配列番号：20

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF3）

配列：

TTATTCGCCA CAAACTGAGC

20

配列番号： 2 1

配列の長さ： 2 0

配列の型：核酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF4）

配列：

TTGTGAAGCT GTGAAGGAAC

20

配列番号： 2 2

配列の長さ： 2 0

配列の型：核酸

鎖の数： 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF5）

配列：

GCTCAGTTTG TGGCGAATAA

20

配列番号：23

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF6）

配列：

GTGGGAGCAG AAGACATTGA

20

配列番号：24

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF7）

配列：

AATGAACAAC TTGCTGTGCT

20

配列番号：25

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF8）

配列：

TGACAAATGT CCTCCTGGTA

20

配列番号：26

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF9）

配列：

AGGTAGGTAC CAGGAGGACA

20

配列番号：27

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF10）

配列：

GAGCTGCCCT CCTGGATTG

20

配列番号：28

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF11）

配列：

CAAACGTAT TTCGCTCTGG

20

配列番号：29

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF12）

配列：

GTGTGAGGAG GCATTCTTCA

20

配列番号：30

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーC19SF）

配列：

GAATCAACTC AAAAAAGTGG AATAGATGTT AC

32

配列番号：31

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーC19SR）

配列：

GTAACATCTA TTCCACTTTT TTGAGTTGAT TC

32

配列番号：32

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーC20SF）

配列：

ATAGATGTTA CCCTGAGTGA GGAGGCATTC

30

配列番号：33

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーC20SR）

配列：

GAATGCCTCC TCACTCAGGG TAACATCTAT

30

配列番号 : 3 4

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA (プライマーC21SF)

配列 :

CAAGATATTG ACCTCAGTGA AAACAGCGTG C

31

配列番号 : 3 5

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA (プライマーC21SR)

配列 :

GCACGCTGTT TTCACTGAGG TCAATATCTT G

31

配列番号 : 3 6

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA (プライマーC22SF)

配列 :

AAAACAATAA AGGCAAGCAA ACCCAGTGAC C

31

配列番号 : 3 7

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA (プライマーC22SR)

配列 :

GGTCACTGGG TTGCTTGCC TTTATTGTTT T

31

配列番号 : 3 8

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA (プライマーC23SF)

配列 :

TCAGTAAAAA TAAGCAGCTT ATAAGTGGCC A

31

配列番号 : 3 9

配列の長さ : 3 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 合成DNA (プライマーC23SR)

配列：

TGGCCAGTTA TAAGCTGCTT ATTTTACTG A

31

配列番号：4 0

配列の長さ：2 2

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF 14）

配列：

TTGGGGTTTA TTGGAGGAGA TG

22

配列番号：4 1

配列の長さ：3 6

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR1F）

配列：

ACCACCCAGG AACCTTGCCC TGACCACTAC TACACA

36

配列番号：4 2

配列の長さ：3 6

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR1R）

配列：

GTCAGGGCAA GGTTCCTGGG TGGTCCACTT AATGGA

36

配列番号：43

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR2F）

配列：

ACCGTGTGCG CCGAATGCAA GGAAGGGCGC TACCTT

36

配列番号：44

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR2R）

配列：

TTCCTTGCAT TCGGCGCACA CGGTCTTCCA CTTTGC

36

配列番号：45

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR3F）

配列：

AACCGCGTGT GCAGATGTCC AGATGGGTTC TTCTCA

36

配列番号：46

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR3R）

配列：

ATCTGGACAT CTGCACACGC GGTGTGGGT GCGATT

36

配列番号：47

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR4F）

配列：

ACAGTTTGCA AATCCGGAAA CAGTGAATCA ACTCAA

36

配列番号：48

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDCR4R）

配列：

ACTGTTTCCG GATTTGCAAA CTGTATTTTCG CTCTGG

36

配列番号：49

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDDD1F）

配列：

AATGTGGAAT AGATATTGAC CTCTGTGAAA ACAGCG

36

配列番号：50

配列の長さ：36

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDDD1R）

配列：

AGAGGTCAAT ATCTATTCCA CATTTTGTGAG TTGATT

36

配列番号：5 1

配列の長さ：3 6

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDDD2F）

配列：

AGATCATCCA AGACGCACTA AAGCACTCAA AGACGT

36

配列番号：5 2

配列の長さ：3 6

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーDDD2R）

配列：

GCTTTAGTGC GTCTTGGATG ATCTTCTTGA CTATAT

36

配列番号：5 3

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーXhoI F）

配列：

GGCTCGAGCG CCCAGCCGCC GCCTCCAAG

29

配列番号：5 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーIF 16）

配列：

TTTGAGTGCT TTAGTGCGTG

20

配列番号：5 5

配列の長さ：3 0

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーCL F）

配列：

TCAGTAAAAA TAAGCTAACT GGAAATGGCC

30

配列番号：5 6

配列の長さ：3 0

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーCL R）

配列：

GGCCATTTCC AGTTAGCTTA TTTTACTGA

30

配列番号：57

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーCC R）

配列：

CCGGATCCTC AGTGCTTTAG TCGTGCAT

29

配列番号：58

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーCCD2 R）

配列：

CCGGATCCTC ATTGGATGAT CTTCTTGAC

29

配列番号：59

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーCCD1 R）

配列：

CCGGATCCTC ATATTCCACA TTTTGTGAGT

29

配列番号：60

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーCCR4 R）

配列：

CCGGATCCTC ATTTGCAAAC TGTATTTTCG

29

配列番号：61

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA（プライマーCCR3 R）

配列：

CCGGATCCTC ATTCGCACAC GCGGTTGTG

29

配列番号： 6 2

配列の長さ： 4 0 1

配列の型： アミノ酸

鎖の数： 1

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 蛋白質 (O C I F - C 1 9 S)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser
-20 -15 -10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His
-5 -1 1 5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro
10 15 20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr
25 30 35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His
40 45 50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu
55 60 65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys
70 75 80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
85 90 95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr
100 105 110

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe
115 120 125

Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Ser		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335

Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe
340 345 350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly
355 360 365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
370 375 380

配列番号 : 6 3

配列の長さ : 4 0 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (O C I F - C 2 0 S)

配列 :

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser
-20 -15 -10
Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His
-5 -1 1 5
Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro
10 15 20
Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr
25 30 35
Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His
40 45 50
Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu
55 60 65
Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys
70 75 80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys		
85	90	95
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr		
100	105	110
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Ser Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290

Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

配列番号：64

配列の長さ：401

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (OCIF-C21S)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser		
-20	-15	-10
Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His		
-5	-1 1	5
Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro		
10	15	20
Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr		
25	30	35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His		
40	45	50
Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu		
55	60	65
Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys		
70	75	80
Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys		
85	90	95
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr		
100	105	110
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245

Ile Gln Asp Ile Asp Leu Ser Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

配列番号 : 6 5

配列の長さ : 4 0 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (O C I F - C 2 2 S)

配列 :

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His		
-5	-1 1	5
Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro		
10	15	20
Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr		
25	30	35
Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His		
40	45	50
Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu		
55	60	65
Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys		
70	75	80
Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys		
85	90	95
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr		
100	105	110
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200

Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Ser Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

配列番号 : 6 6

配列の長さ : 4 0 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質（O C I F - C 2 3 S）

配列：

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15					-10				
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					-1	1				5				
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60					65				
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75					80				
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85					90					95				
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr
100					105					110				
Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe
115					120					125				
Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys	Arg	Lys	His	Thr	Asn
130					135					140				
Cys	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr
145					150					155				

His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365

Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Ser Leu

370

375

380

配列番号 : 6 7

配列の長さ : 3 6 0

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (O C I F - D C R 1)

配列 :

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr

-5

-1 1

5

Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val

10

15

20

Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His

25

30

35

Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu

40

45

50

Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val

55

60

65

Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro

70

75

80

Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg

85

90

95

Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys

100

105

110

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser		
115	120	125
Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe		
130	135	140
Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser		
145	150	155
Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser		
160	165	170
Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe		
175	180	185
Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile		
190	195	200
Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val		
205	210	215
Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg		
220	225	230
Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp		
235	240	245
Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu		
250	255	260
Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr		
265	270	275
Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His		
280	285	290
Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe		
295	300	305
Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu		
310	315	320

Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

325

330

335

配列番号 : 6 8

配列の長さ : 3 5 9

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (O C I F - D C R 2)

配列 :

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe

40

45

50

Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln

55

60

65

Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp

70

75

80

Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys

85

90

95

His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly

100

105

110

Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr		
115	120	125
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe		
130	135	140
Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val		
145	150	155
Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val		
160	165	170
Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln		
175	180	185
Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val		
190	195	200
Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln		
205	210	215
Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser		
220	225	230
Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile		
235	240	245
Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys		
250	255	260
Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu		
265	270	275
Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe		
280	285	290
Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu		
295	300	305
His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu		
310	315	320

Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

325

330

335

配列番号 : 6 9

配列の長さ : 3 6 3

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (O C I F - D C R 3)

配列 :

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

40

45

50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55

60

65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70

75

80

Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala

85

90

95

Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu

100

105

110

Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn		
115	120	125
Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu		
130	135	140
Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn		
145	150	155
Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn		
160	165	170
Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu		
175	180	185
Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp		
190	195	200
Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu		
205	210	215
Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu		
220	225	230
Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly		
235	240	245
Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp		
250	255	260
Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp		
265	270	275
Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys		
280	285	290
Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr		
295	300	305
Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys		
310	315	320

Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile

325

330

335

Ser Cys Leu

340

配列番号：70

配列の長さ：359

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (OCIF-DCR4)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

40

45

50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55

60

65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70

75

80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

85

90

95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr		
100	105	110
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr		
115	120	125
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe		
130	135	140
Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val		
145	150	155
Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val		
160	165	170
Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln		
175	180	185
Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val		
190	195	200
Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln		
205	210	215
Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser		
220	225	230
Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile		
235	240	245
Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys		
250	255	260
Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu		
265	270	275
Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe		
280	285	290
Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu		
295	300	305

His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu
 310 315 320
 Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
 325 330 335

配列番号：7 1

配列の長さ：3 2 6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (O C I F - D D D 1)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser
 -20 -15 -10
 Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His
 -5 -1 1 5
 Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro
 10 15 20
 Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr
 25 30 35
 Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His
 40 45 50
 Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu
 55 60 65
 Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys
 70 75 80
 Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
 85 90 95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr		
100	105	110
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
175	180	185
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
190	195	200
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
205	210	215
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
220	225	230
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
235	240	245
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
250	255	260
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
265	270	275
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
280	285	290
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
295	300	305

配列番号：72

配列の長さ：327

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (OCIF-DDD2)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

40

45

50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55

60

65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70

75

80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

85

90

95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

100

105

110

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe

115

120

125

Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys		
250	255	260
Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser		
265	270	275
Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile		
280	285	290
Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
295	300	305

配列番号：73

配列の長さ：399

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質（O C I F - C L）

配列：

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15						-10			
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					-1	1					5			
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60					65				
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75					80				
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85					90					95				
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr
100					105					110				
Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe
115					120					125				
Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys	Arg	Lys	His	Thr	Asn
130					135					140				
Cys	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr
145					150					155				

His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365

Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser

370

375

配列番号：74

配列の長さ：351

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (OCIF-CC)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

40

45

50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55

60

65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70

75

80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

85

90

95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

100

105

110

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320

Met His Ala Leu Lys His

325

330

配列番号 : 7 5

配列の長さ : 2 7 2

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (O C I F - C D D 2)

配列 :

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

40

45

50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55

60

65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70

75

80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

85

90

95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

100

105

110

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln		
250		

配列番号：76

配列の長さ：197

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質（OCIF-CDD1）

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser
 -20 -15 -10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His
 -5 -1 1 5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro
 10 15 20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr
 25 30 35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His
 40 45 50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu
 55 60 65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys
 70 75 80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
 85 90 95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr
 100 105 110

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe
 115 120 125

Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
 130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr
 145 150 155

His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys
 160 165 170

Gly Ile
 175

配列番号： 7 7

配列の長さ： 1 4 3

配列の型： アミノ酸

鎖の数： 1

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 蛋白質 (O C I F - C C R 4)

配列：

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15					-10				
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					-1	1				5				
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60					65				
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75					80				
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85					90					95				
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr
100					105					110				
Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys							
115					120									

配列番号：78

配列の長さ：106

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (OCIF-CCR3)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

40

45

50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55

60

65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70

75

80

Glu

85

配列番号：79

配列の長さ：393

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (O C I F - C B s t)

配列：

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15						-10			
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					-1	1					5			
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60					65				
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75					80				
Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys
85					90					95				
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr
100					105					110				
Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe
115					120					125				
Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys	Arg	Lys	His	Thr	Asn
130					135					140				

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350

Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly

355

360

365

Asn Leu Val

370

配列番号：80

配列の長さ：321

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (O C I F - C S p h)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

10

15

20

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

25

30

35

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

40

45

50

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55

60

65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70

75

80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

85

90

95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr		
100	105	110
Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe		
115	120	125
Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn		
130	135	140
Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr		
145	150	155
His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys		
160	165	170
Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala		
175	180	185
Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp		
190	195	200
Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile		
205	210	215
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys		
220	225	230
Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile		
235	240	245
Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Ser Leu Asp		
295	300	

配列番号：81

配列の長さ：202

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質 (O C I F - C B s p)

配列：

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser

-20

-15

-10

Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His

-5

-1 1

5

10

15

20

Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro

25

30

35

Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr

40

45

50

Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His

55

60

65

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

70

75

80

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

85

90

95

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

100

105

110

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

115

120

125

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe

130

135

140

Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
 145 150 155
 Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr
 160 165 170
 His Asp Asn Ile Cys Ser Gly
 175 180

配列番号 : 8 2

配列の長さ : 8 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質 (O C I F - C P s t)

配列 :

Met Asn Asn Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser
 -20 -15 -10
 Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His
 -5 -1 1 5
 Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro
 10 15 20
 Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr
 25 30 35
 Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His
 40 45 50
 Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Leu Val
 55 60

配列番号 : 8 3

配列の長さ : 1 2 0 6

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF-C19S)

配列：

```
ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AAAGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080
GTCCTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
TATCAGAAGT TATTTTLAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200
TTATAA 1206
```

配列番号： 8 4

配列の長さ： 1 2 0 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 1

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： c D N A (O C I F - C 2 0 S)

配列：

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGAGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAACT 1080
GTCACCTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200

配列番号 : 8 5

配列の長さ : 1 2 0 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-C21S)

配列 :

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCAG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080

GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
TATCAGAAGT TATTTT TAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200
TTATAA 1206

配列番号 : 8 6

配列の長さ : 1 2 0 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-C22S)

配列 :

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCAAGCAAA 960

CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
 ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080
 GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
 TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200
 TTATAA 1206

配列番号 : 8 7

配列の長さ : 1 2 0 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-C23S)

配列 :

ATGAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
 CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
 CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
 GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
 AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
 CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
 CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
 AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
 AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
 AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840

GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
 AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
 CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
 ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080
 GTCACCTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
 TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCAGC 1200
 TTATAA 1206

配列番号 : 8 8

配列の長さ : 1 0 8 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-DCR1)

配列 :

ATGAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAACCTT GCCCTGACCA CTACTACACA GACAGCTGGC ACACCAGTGA CGAGTGTCTA 120
 TACTGCAGCC CCGTGTGCAA GGAGCTGCAG TACGTCAAGC AGGAGTGCAA TCGCACCCAC 180
 AACCGCGTGT GCGAATGCAA GGAAGGGCGC TACCTTGAGA TAGAGTTCTG CTTGAAACAT 240
 AGGAGCTGCC CTCCTGGATT TGGAGTGGTG CAAGCTGGAA CCCCAGAGCG AAATACAGTT 300
 TGCAAAAGAT GTCCAGATGG GTTCTTCTCA AATGAGACGT CATCTAAAGC ACCCTGTAGA 360
 AAACACACAA ATTGCAGTGT CTTTGGTCTC CTGCTAACTC AGAAAGGAAA TGCAACACAC 420
 GACAACATAT GTTCCGGAAG CAGTGAATCA ACTCAAAAAT GTGGAATAGA TGTTACCCTG 480
 TGTGAGGAGG CATTCTTCAG GTTTGCTGTT CCTACAAAGT TTACGCCTAA CTGGCTTAGT 540
 GTCTTGGTAG ACAATTTGCC TGGCACCAAA GTAAACGCAG AGAGTGTAGA GAGGATAAAA 600
 CGGCAACACA GCTCACAAGA ACAGACTTTC CAGCTGCTGA AGTTATGGAA ACATCAAAAC 660
 AAAGACCAAG ATATAGTCAA GAAGATCATC CAAGATATTG ACCTCTGTGA AAACAGCGTG 720

CAGCGGCACA TTGGACATGC TAACCTCACC TTCGAGCAGC TTCGTAGCTT GATGGAAAGC 780
 TTACCGGGAA AGAAAGTGGG AGCAGAAGAC ATTGAAAAA CAATAAAGGC ATGCAAACCC 840
 AGTGACCAGA TCCTGAAGCT GCTCAGTTTG TGGCGAATAA AAAATGGCGA CCAAGACACC 900
 TTGAAGGGCC TAATGCACGC ACTAAAGCAC TCAAAGACGT ACCACTTTCC CAAAACGTGC 960
 ACTCAGAGTC TAAAGAAGAC CATCAGGTTC CTTACAGCT TCACAATGTA CAAATTGTAT 1020
 CAGAAGTTAT TTTTAGAAAT GATAGGTAAC CAGGTCCAAT CAGTAAAAAT AAGCTGCTTA 1080
 TAA 1083

配列番号 : 8 9

配列の長さ : 1 0 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-DCR2)

配列 :

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCG AATGCAAGGA AGGGCGCTAC CTTGAGATAG AGTTCTGCTT GAAACATAGG 240
 AGCTGCCCTC CTGGATTGG AGTGGTGCAA GCTGGAACCC CAGAGCGAAA TACAGTTTGC 300
 AAAAGATGTC CAGATGGGTT CTTCTCAAAT GAGACGTCAT CTAAAGCACC CTGTAGAAAA 360
 CACACAAATT GCAGTGTCTT TGGTCTCCTG CTAACCTAGA AAGGAAATGC AACACACGAC 420
 AACATATGTT CCGGAAACAG TGAATCAACT CAAAAATGTG GAATAGATGT TACCCTGTGT 480
 GAGGAGGCAT TCTTCAGGTT TGCTGTTTCT ACAAAGTTTA CGCCTAACTG GCTTAGTGTC 540
 TTGGTAGACA ATTTGCCTGG CACCAAAGTA AACGCAGAGA GTGTAGAGAG GATAAAACGG 600
 CAACACAGCT CACAAGAACA GACTTTCCAG CTGCTGAAGT TATGGAAACA TCAAAACAAA 660
 GACCAAGATA TAGTCAAGAA GATCATCCAA GATATTGACC TCTGTGAAAA CAGCGTGCAG 720

CGGCACATTG GACATGCTAA CCTCACCTTC GAGCAGCTTC GTAGCTTGAT GGAAAGCTTA 780
 CCGGGAAAGA AAGTGGGAGC AGAAGACATT GAAAAACAA TAAAGGCATG CAAACCCAGT 840
 GACCAGATCC TGAAGCTGCT CAGTTTGTGG CGAATAAAAA ATGGCGACCA AGACACCTTG 900
 AAGGGCCTAA TGCACGCACT AAAGCACTCA AAGACGTACC ACTTTCCCAA AACTGTCACT 960
 CAGAGTCTAA AGAAGACCAT CAGGTTTCCTT CACAGCTTCA CAATGTACAA ATTGTATCAG 1020
 AAGTTATTTT TAGAAATGAT AGGTAACCAG GTCCAATCAG TAAAAATAAG CTGCTTATAA 1080

配列番号：90

配列の長さ：1092

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF-DCR3)

配列：

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
 CACAACCGCG TGTGCAGATG TCCAGATGGG TTCTTCTCAA ATGAGACGTC ATCTAAAGCA 360
 CCCTGTAGAA AACACACAAA TTGCAGTGTG TTTGGTCTCC TGCTAACTCA GAAAGGAAAT 420
 GCAACACACG ACAACATATG TTCCGGAAAC AGTGAATCAA CTCAAAAATG TGGAATAGAT 480
 GTTACCCTGT GTGAGGAGGC ATTCTTCAGG TTTGCTGTTC CTACAAAGTT TACGCCTAAC 540
 TGGCTTAGTG TCTTGGTAGA CAATTTGCCT GGCACCAAAG TAAACGCAGA GAGTGTAGAG 600
 AGGATAAAAC GGCAACACAG CTCACAAGAA CAGACTTTCC AGCTGCTGAA GTTATGGAAA 660
 CATCAAAACA AAGACCAAGA TATAGTCAAG AAGATCATCC AAGATATTGA CCTCTGTGAA 720
 AACAGCGTGC AGCGGCACAT TGGACATGCT AACCTCACCT TCGAGCAGCT TCGTAGCTTG 780

ATGGAAAGCT TACCGGGAAA GAAAGTGGGA GCAGAAGACA TTGAAAAAAC AATAAAGGCA 840
 TGCAAACCCA GTGACCAGAT CCTGAAGCTG CTCAGTTTGT GGCGAATAAA AAATGGCGAC 900
 CAAGACACCT TGAAGGGCCT AATGCACGCA CTAAAGCACT CAAAGACGTA CCACTTTCCC 960
 AAAACTGTCA CTCAGAGTCT AAAGAAGACC ATCAGGTTCC TTCACAGCTT CACAATGTAC 1020
 AAATTGTATC AGAAGTTATT TTTAGAAATG ATAGGTAACC AGGTCCAATC AGTAAAAATA 1080
 AGCTGCTTAT AA 1092

配列番号 : 9 1

配列の長さ : 1 0 8 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-DCR4)

配列 :

ATGAACAACCT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
 CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
 CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
 GTTTGCAAAT CCGGAAACAG TGAATCAACT CAAAAATGTG GAATAGATGT TACCCTGTGT 480
 GAGGAGGCAT TCTTCAGGTT TGCTGTTTCT ACAAAGTTTA CGCCTAACTG GCTTAGTGTC 540
 TTGGTAGACA ATTTGCCTGG CACCAAAGTA AACGCAGAGA GTGTAGAGAG GATAAAACGG 600
 CAACACAGCT CACAAGAACA GACTTTCCAG CTGCTGAAGT TATGGAAACA TCAAAACAAA 660
 GACCAAGATA TAGTCAAGAA GATCATCCAA GATATTGACC TCTGTGAAAA CAGCGTGCAG 720
 CGGCACATTG GACATGCTAA CCTCACCTTC GAGCAGCTTC GTAGCTTGAT GGAAAGCTTA 780

CCGGGAAAGA AAGTGGGAGC AGAAGACATT GAAAAACAA TAAAGGCATG CAAACCCAGT 840
GACCAGATCC TGAAGCTGCT CAGTTTGTGG CGAATAAAAA ATGGCGACCA AGACACCTTG 900
AAGGGCCTAA TGCACGCACT AAAGCACTCA AAGACGTACC ACTTTCCCAA AACTGTCACT 960
CAGAGTCTAA AGAAGACCAT CAGGTCCTT CACAGCTTCA CAATGTACAA ATTGTATCAG 1020
AAGTTATTTT TAGAAATGAT AGGTAACCAG GTCCAATCAG TAAAAATAAG CTGCTTATAA 1080

配列番号 : 9 2

配列の長さ : 9 8 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-DDD1)

配列 :

ATGAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCAGAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATATTGAC 600
CTCTGTGAAA ACAGCGTGCA GCGGCACATT GGACATGCTA ACCTCACCTT CGAGCAGCTT 660
CGTAGCTTGA TGGAAAGCTT ACCGGGAAAG AAAGTGGGAG CAGAAGACAT TGAAAAAACA 720
ATAAAGGCAT GCAAACCCAG TGACCAGATC CTGAAGCTGC TCAGTTTGTG GCGAATAAAA 780
AATGGCGACC AAGACACCTT GAAGGGCCTA ATGCACGCAC TAAAGCACTC AAAGACGTAC 840

CACTTTCCCA AAACGTGCAC TCAGAGTCTA AAGAAGACCA TCAGGTTTCCT TCACAGCTTC 900
ACAATGTACA AATTGTATCA GAAGTTATTT TTAGAAATGA TAGGTAACCA GGTCCAATCA 960
GTAAAAATAA GCTGCTTATA A 981

配列番号：93

配列の長さ：984

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF-DDD2)

配列：

ATGAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGACG CACTAAAGCA CTCAAAGACG 840
TACCACTTTC CCAAACTGT CACTCAGAGT CTAAAGAAGA CCATCAGGTT CCTTCACAGC 900
TTCACAATGT ACAAATTGTA TCAGAAGTTA TTTT TAGAAA TGATAGGTAA CCAGGTCCAA 960

配列番号：94

配列の長さ：1200

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF-CL)

配列：

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080

GTCAC TCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
TATCAGAAGT TATTTT TAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTAA 1200

配列番号 : 9 5

配列の長さ : 1 0 5 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-CC)

配列 :

ATGAACA ACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCGA GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020

ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTGA

1056

配列番号 : 9 6

配列の長さ : 8 1 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-CDD2)

配列 :

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAATGA 819

配列番号 : 9 7

配列の長さ : 5 9 4

配列の型 : 核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF-CDD1)

配列：

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT ATGA 594

配列番号：98

配列の長さ：432

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF-CCR4)

配列：

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240

CTATACTGCA GCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAT GA 432

配列番号 : 9 9

配列の長さ : 3 2 1

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-CCR3)

配列 :

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG A 321

配列番号 : 1 0 0

配列の長さ : 1 1 8 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-CBst)

配列 :

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
 CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
 CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
 GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
 AGAAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
 CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
 CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
 AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
 AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
 AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
 GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
 AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
 CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
 ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080
 GTCACCTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
 TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCTAGTCT AG 1182

配列番号：101

配列の長さ：966

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA (OCIF-CSpH)

配列：

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
 CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
 CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
 GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
 AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
 CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
 CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
 AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
 AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
 AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
 GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
 AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCTAGTCTA 960
 GACTAG 966

配列番号 : 1 0 2

配列の長さ : 5 6 4

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-CBsp)

配列 :

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
 CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
 CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
 GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCCTGT 480
 AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
 CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
 CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
 AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
 AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
 AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
 GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
 AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCTAGTCTA 960
 GACTAG 966

CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
 CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
 CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCGAGA GCGAAATACA 420
 GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
 AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
 CACGACAACA TATGTTCCGG CTAG 564

配列番号 : 1 0 3

配列の長さ : 2 5 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA (OCIF-CPst)

配列 :

ATGAACAACT TGCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
 CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
 TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
 GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
 CTATACCTAG TCTAG 255

配列番号 : 1 0 4

配列の長さ : 1 3 1 7

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー：直鎖状

配列の種類：g e n o m i c DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-1)

配列：

```
CTGGAGACAT ATAAC TTGAA CACTTGGCCC TGATGGGGAA GCAGCTCTGC AGGGACTTTT 60
TCAGCCATCT GTAAACAATT TCAGTGGCAA CCCGCGAACT GTAATCCATG AATGGGACCA 120
CACTTTACAA GTCATCAAGT CTAAC TTCTA GACCAGGGAA TTAATGGGGG AGACAGCGAA 180
CCCTAGAGCA AAGTGCCAAA CTTCTGTCGA TAGCTTGAGG CTAGTGGAAA GACCTCGAGG 240
AGGCTACTCC AGAAGTTCAG CGCGTAGGAA GCTCCGATAC CAATAGCCCT TTGATGATGG 300
TGGGGTTGGT GAAGGGAACA GTGCTCCGCA AGGTTATCCC TGCCCCAGGC AGTCCAATTT 360
TCACTCTGCA GATTCTCTCT GGCTCTAACT ACCCCAGATA ACAAGGAGTG AATGCAGAAT 420
AGCACGGGCT TTAGGGCCAA TCAGACATTA GTTAGAAAAA TTCCTACTAC ATGGTTTATG 480
TAAACTTGAA GATGAATGAT TGCGAACTCC CCGAAAAGGG CTCAGACAAT GCCATGCATA 540
AAGAGGGGCC CTGTAATTTG AGGTTTCAGA ACCCGAAGTG AAGGGGTCAG GCAGCCGGGT 600
ACGGCGGAAA CTCACAGCTT TCGCCCAGCG AGAGGACAAA GGTCTGGGAC AACTCCAAC 660
TGCGTCCGGA TCTTGGCTGG ATCGGACTCT CAGGGTGGAG GAGACACAAG CACAGCAGCT 720
GCCCAGCGTG TGCCCAGCCC TCCCACCGCT GGTCCCGGCT GCCAGGAGGC TGGCCGCTGG 780
CGGGAAGGGG CCGGGAACC TCAGAGCCCC GCGGAGACAG CAGCCGCCTT GTTCCTCAGC 840
CCGGTGGCTT TTTTTTCCCC TGCTCTCCCA GGGGACAGAC ACCACCGCCC CACCCCTCAC 900
GCCCCACCTC CCTGGGGGAT CCTTTCCGCC CCAGCCCTGA AAGCGTTAAT CCTGGAGCTT 960
TCTGCACACC CCCCGACCGC TCCCGCCCAA GCTTCCTAAA AAAGAAAGGT GCAAAGTTTG 1020
GTCCAGGATA GAAAAATGAC TGATCAAAGG CAGGCGATAC TTCCTGTTGC CGGGACGCTA 1080
TATATAACGT GATGAGCGCA CGGGCTGCGG AGACGCACCG GAGCGCTCGC CCAGCCGCCG 1140
CCTCCAAGCC CCTGAGGTTT CCGGGGACCA CA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC 1193
```

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys

-20

-15

GCG CTC GTG GTAAGTCCCT GGGCCAGCCG ACGGGTGCCC GGCGCCTGGG

1242

Ala Leu Val

GAGGCTGCTG CCACCTGGTC TCCCAACCTC CCAGCGGACC GCGGGGGAAA AAGGCTCCAC 1302
TCGCTCCCTC CCAAG 1317

配列番号 : 105

配列の長さ :

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-2)

配列 :

GCTTACTTTG TGCCAAATCT CATTAGGCTT AAGGTAATAC AGGACTTTGA GTCAAATGAT 60
ACTGTTGCAC ATAAGAACAA ACCTATTTTC ATGCTAAGAT GATGCCACTG TGTTCTTTC 120
TCCTTCTAG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG TTT 171

Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe

-10

-5

-1 +1

CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG TTG 219
Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu

5

10

15

TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA GCA 267
Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala
20 25 30 35

AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA GAC	315
Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp	
40 45 50	
AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG	363
Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys	
55 60 65	
GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC GTG	411
Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val	
70 75 80	
TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG AAA	459
Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys	
85 90 95	
CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT G GTACGTGTCA	509
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala	
100 105 110	
ATGTGCAGCA AAATTAATTA GGATCATGCA AAGTCAGATA GTTGTGACAG TTTAGGAGAA	569
CACTTTTGTT CTGATGACAT TATAGGATAG CAAATTGCAA AGGTAATGAA ACCTGCCAGG	629
TAGGTACTAT GTGTCTGGAG TGCTTCCAAA GGACCATTGC TCAGAGGAAT ACTTTGCCAC	689
TACAGGGCAA TTTAATGACA AATCTCAAAT GCAGCAAATT ATTCTCTCAT GAGATGCATG	749
ATGGTTTTTT TTTTTTTTTT TAAAGAAACA AACTCAAGTT GCACTATTGA TAGTTGATCT	809
ATACCTCTAT ATTTCACTTC AGCATGGACA CCTTCAAAC TGCAGCACTTT TTGACAAACA	869
TCAGAAATGT TAATTTATAC CAAGAGAGTA ATTATGCTCA TATTAATGAG ACTCTGGAGT	929
GCTAACAATA AGCAGTTATA ATTAATTATG TAAAAAATGA GAATGGTGAG GGGAAATTGCA	989

TTTCATTATT AAAAACAAGG CTAGTTCTTC CTTTAGCATG GGAGCTGAGT GTTTGGGAGG	1049
GTAAGGACTA TAGCAGAATC TCTTCAATGA GCTTATTCTT TATCTTAGAC AAAACAGATT	1109
GTCAAGCCAA GAGCAAGCAC TTGCCTATAA ACCAAGTGCT TTCTCTTTTG CATTTTGAAC	1169
AGCATTGGTC AGGGCTCATG TGTATTGAAT CTTTTAAACC AGTAACCCAC GTTTTTTTTC	1229
TGCCACATTT GCGAAGCTTC AGTGCAGCCT ATAACTTTTC ATAGCTTGAG AAAATTAAGA	1289
GTATCCACTT ACTTAGATGG AAGAAGTAAT CAGTATAGAT TCTGATGACT CAGTTTGAAG	1349
CAGTGTTTCT CAACTGAAGC CCTGCTGATA TTTTAAGAAA TATCTGGATT CCTAGGCTGG	1409
ACTCCTTTTT GTGGGCAGCT GTCCTGCGCA TTGTAGAATT TTGGCAGCAC CCCTGGACTC	1469
TAGCCACTAG ATACCAATAG CAGTCCTTCC CCCATGTGAC AGCCAAAAAT GTCTTCAGAC	1529
ACTGTCAAAT GTCGCCAGGT GGCAAAATCA CTCCTGGTTG AGAACAGGGT CATCAATGCT	1589
AAGTATCTGT AACTATTTTA ACTCTCAAAA CTTGTGATAT ACAAAGTCTA AATTATTAGA	1649
CGACCAATAC TTTAGGTTTA AAGGCATACA AATGAAACAT TCAAAAATCA AAATCTATTC	1709
TGTTTCTCAA ATAGTGAATC TTATAAAATT AATCACAGAA GATGCAAATT GCATCAGAGT	1769
CCCTTAAAAAT TCCTCTTCGT ATGAGTATTT GAGGGAGGAA TTGGTGATAG TTCCTACTTT	1829
CTATTGGATG GTACTTTGAG ACTCAAAAGC TAAGCTAAGT TGTGTGTGTG TCAGGGTGCG	1889
GGGTGTGGAA TCCCATCAGA TAAAAGCAAA TCCATGTAAT TCATTCAGTA AGTTGTATAT	1949
GTAGAAAAAT GAAAAGTGGG CTATGCAGCT TGGAACTAG AGAATTTTGA AAAATAATGG	2009
AAATCACAAG GATCTTTCTT AAATAAGTAA GAAAATCTGT TTGTAGAATG AAGCAAGCAG	2069
GCAGCCAGAA GACTCAGAAC AAAAGTACAC ATTTTACTCT GTGTACACTG GCAGCACAGT	2129
GGGATTTATT TACCTCTCCC TCCCTAAAAA CCCACACAGC GGTTCTCTT GGGAAATAAG	2189
AGGTTTCCAG CCCAAAGAGA AGGAAAGACT ATGTGGTGTT ACTCTAAAAA GTATTTAATA	2249
ACCGTTTTGT TGTGCTGTT GCTGTTTTGA AATCAGATTG TCTCCTCTCC ATATTTTATT	2309
TACTTCATTC TGTTAATTCC TGTGGAATTA CTTAGAGCAA GCATGGTGAA TTCTCAACTG	2369
TAAAGCCAAA TTTCTCCATC ATTATAATTT CACATTTTGC CTGGCAGGTT ATAATTTTAA	2429
TATTTCCACT GATAGTAATA AGGTAAAATC ATTACTTAGA TGGATAGATC TTTTTCATAA	2489
AAAGTACCAT CAGTTATAGA GGAAGTCAT GTTCATGTTT AGGAAGGTCA TTAGATAAAG	2549
CTTCTGAATA TATTATGAAA CATTAGTTCT GTCATTCTTA GATTCTTTTT GTTAAATAAC	2609
TTTAAAAGCT AACTTACCTA AAAGAAATAT CTGACACATA TGAACCTCTC ATTAGGATGC	2669

AGGAGAAGAC CCAAGCCACA GATATGTATC TGAAGAATGA ACAAGATTCT TAGGCCCCGGC	2729
ACGGTGGCTC ACATCTGTAA TCTCAAGAGT TTGAGAGGTC AAGGCGGGCA GATCACCTGA	2789
GGTCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAAC ATGATGAAAC CCTGCCTCTA CTAAAAATAC	2849
AAAAATTAGC AGGGCATGGT GGTGCATGCC TGCAACCCTA GCTACTCAGG AGGCTGAGAC	2909
AGGAGAATCT CTTGAACCCT CGAGGCGGAG GTTGTGGTGA GCTGAGATCC CTCTACTGCA	2969
CTCCAGCCTG GGTGACAGAG ATGAGACTCC GTCCCTGCCG CCGCCCCCGC CTTCCCCCCC	3029
AAAAAGATTC TTCTTCATGC AGAACATACG GCAGTCAACA AAGGGAGACC TGGGTCCAGG	3089
TGTCCAAGTC ACTTATTTTCG AGTAAATTAG CAATGAAAGA ATGCCATGGA ATCCCTGCCC	3149
AAATACCTCT GCTTATGATA TTGTAGAATT TGATATAGAG TTGTATCCCA TTTAAGGAGT	3209
AGGATGTAGT AGGAAAGTAC TAAAAACAAA CACACAAACA GAAAACCCTC TTTGCTTTGT	3269
AAGGTGGTTC CTAAGATAAT GTCAGTGCAA TGCTGGAAAT AATATTTAAT ATGTGAAGGT	3329
TTTAGGCTGT GTTTTCCCCT CCTGTTCTTT TTTTCTGCCA GCCCTTTGTC ATTTTGCAG	3389
GTCAATGAAT CATGTAGAAA GAGACAGGAG ATGAAACTAG AACCAGTCCA TTTTGCCCCT	3449
TTTTTTATTT TCTGGTTTTG GTAAAAGATA CAATGAGGTA GGAGGTTGAG ATTTATAAAT	3509
GAAGTTTAAT AAGTTTCTGT AGCTTTGATT TTTCTCTTTC ATATTTGTTA TCTTGATAA	3569
GCCAGAATTG GCCTGTAAAA TCTACATATG GATATTGAAG TCTAAATCTG TTCAACTAGC	3629
TTACACTAGA TGGAGATATT TTCATATTCA GATACACTGG AATGTATGAT CTAGCCATGC	3689
GTAATATAGT CAAGTGTTTG AAGGTATTTA TTTTAAATAG CGTCTTTAGT TGTGGACTGG	3749
TTCAAGTTTT TCTGCCAATG ATTTCTTCAA ATTTATCAAA TATTTTCCA TCATGAAGTA	3809
AAATGCCCTT GCAGTCACCC TTCCTGAAGT TTGAACGACT CTGCTGTTTT AAACAGTTTA	3869
AGCAAATGGT ATATCATCTT CCGTTTACTA TGTAGCTTAA CTGCAGGCTT ACGCTTTTGA	3929
GTCAGCGGCC AACTTTATTG CCACCTTCAA AAGTTTATTA TAATGTTGTA AATTTTACT	3989
TCTCAAGGTT AGCATACTTA GGAGTTGCTT CACAATTAGG ATTCAGGAAA GAAAGAAGTT	4049
CAGTAGGAAC TGATTGGAAT TTAATGATGC AGCATTCAAT GGGTACTAAT TTCAAAGAAT	4109
GATATTACAG CAGACACACA GCAGTTATCT TGATTTTCTA GGAATAATTG TATGAAGAAT	4169
ATGGCTGACA ACACGGCCTT ACTGCCACTC AGCGGAGGCT GGACTAATGA ACACCCTACC	4229
CTTCTTTCCT TTCCTCTCAC ATTTTCATGAG CGTTTTGTAG GTAACGAGAA AATTGACTTG	4289
CATTTGCATT ACAAGGAGGA GAAACTGGCA AAGGGGATGA TGGTGGAAGT TTTGTTCTGT	4349

CTAATGAAGT GAAAAATGAA AATGCTAGAG TTTTGTGCAA CATAATAGTA GCAGTAAAAA 4409
 CCAAGTGAAA AGTCTTTCCA AAAGTGTGTT AAGAGGGCAT CTGCTGGGAA ACGATTGAG 4469
 GAGAAGGTAC TAAATTGCTT GGTATTTTCC GTAG GA ACC CCA GAG CGA AAT ACA 4523

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr

115

GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA AAT GAG ACG TCA TCT 4571
 Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser
 120 125 130 135

AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT GTC TTT GGT CTC CTG 4619
 Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu
 140 145 150

CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC ATA TGT TCC GGA AAC 4667
 Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn
 155 160 165

AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA G GTAATTACAT TCCAAAATAC 4715
 Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile
 170 175

GTCTTTGTAC GATTTTGTAG TATCATCTCT CTCTCTGAGT TGAACACAAG GCCTCCAGCC 4775
 ACATTCTTGG TCAAACCTAC ATTTTCCCTT TCTTGAATCT TAACCAGCTA AGGCTACTCT 4835
 CGATGCATTA CTGCTAAAGC TACCACTCAG AATCTCTCAA AAAGTCACTCT TCTCACAGAT 4895
 AACACCTCAA AGCTTGATTT TCTCTCCTTT CACACTGAAA TCAAATCTTG CCCATAGGCA 4955
 AAGGGCAGTG TCAAGTTTGC CACTGAGATG AAATTAGGAG AGTCCAAACT GTAGAATTCA 5015
 CGTTGTGTGT TATTACTTTC ACGAATGTCT GTATTATTAA CTAAAGTATA TATTGGCAAC 5075

TAAGAAGCAA	AGTGATATAA	ACATGATGAC	AAATTAGGCC	AGGCATGGTG	GCTTACTCCT	5135
ATAATCCCAA	CATTTTGGGG	GGCCAAGGTA	GGCAGATCAC	TTGAGGTCAG	GATTTCAAGA	5195
CCAGCCTGAC	CAACATGGTG	AAACCTTGTC	TCTACTAAAA	ATACAAAAAT	TAGCTGGGCA	5255
TGGTAGCAGG	CACTTCTAGT	ACCAGCTACT	CAGGGCTGAG	GCAGGAGAAT	CGCTTGAACC	5315
CAGGAGATGG	AGGTTGCAGT	GAGCTGAGAT	TGTACCACTG	CACTCCAGTC	TGGGCAACAG	5375
AGCAAGATTT	CATCACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	ACACATTAGA	AATGTGTACT	5435
TGGCTTTGTT	ACCTATGGTA	TTAGTGCATC	TATTGCATGG	AACTTCCAAG	CTACTCTGGT	5495
TGTGTTAAGC	TCTTCATTGG	GTACAGGTCA	CTAGTATTAA	GTTCAGGTTA	TTCGGATGCA	5555
TTCCACGGTA	GTGATGACAA	TTCATCAGGC	TAGTGTGTGT	GTTCACCTTG	TCACTCCCAC	5615
CACTAGACTA	ATCTCAGACC	TTCACTCAAA	GACACATTAC	ACTAAAGATG	ATTTGCTTTT	5675
TTGTGTTTAA	TCAAGCAATG	GTATAAACCA	GCTTGACTCT	CCCCAAACAG	TTTTTCGTAC	5735
TACAAAGAAG	TTTATGAAGC	AGAGAAATGT	GAATTGATAT	ATATATGAGA	TTCTAACCCA	5795
GTTCCAGCAT	TGTTTCATTG	TGTAATTGAA	ATCATAGACA	AGCCATTTTA	GCCTTTGCTT	5855
TCTTATCTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAATGA	AGGAAGGGGT	ATTAAAAGGA	GTGATCAAAT	5915
TTTAACATTC	TCTTTAATTA	ATTCATTTTT	AATTTTACTT	TTTTTCATTT	ATTGTGCACT	5975
TACTATGTGG	TACTGTGCTA	TAGAGGCTTT	AACATTTATA	AAAACACTGT	GAAAGTTGCT	6035
TCAGATGAAT	ATAGGTAGTA	GAACGGCAGA	ACTAGTATTC	AAAGCCAGGT	CTGATGAATC	6095
CAAAAACAAA	CACCCATTAC	TCCCATTTTC	TGGGACATAC	TTACTCTACC	CAGATGCTCT	6155
GGGCTTTGTA	ATGCCTATGT	AAATAACATA	GTTTTATGTT	TGGTTATTTT	CCTATGTAAT	6215
GTCTACTTAT	ATATCTGTAT	CTATCTCTTG	CTTTGTTTCC	AAAGGTAAAC	TATGTGTCTA	6275
AATGTGGGCA	AAAAATAACA	CACTATTCCA	AATTACTGTT	CAAATTCCTT	TAAGTCAGTG	6335
ATAATTATTT	GTTTTGACAT	TAATCATGAA	GTTCCCTGTG	GGTACTAGGT	AAACCTTTAA	6395
TAGAATGTTA	ATGTTTGTAT	TCATTATAAG	AATTTTGGC	TGTTACTTAT	TTACAACAAT	6455
ATTTCACTCT	AATTAGACAT	TTACTAAACT	TTCTCTTGAA	AACAATGCCC	AAAAAAGAAC	6515
ATTAGAAGAC	ACGTAAGCTC	AGTTGGTCTC	TGCCACTAAG	ACCAGCCAAC	AGAAGCTTGA	6575
TTTTATTCAA	ACTTTGCATT	TTAGCATATT	TTATCTTGGA	AAATTCAATT	GTGTTGGTTT	6635
TTTGTTTTTG	TTTGTATTGA	ATAGACTCTC	AGAAATCCAA	TTGTTGAGTA	AATCTTCTGG	6695
GTTTTCTAAC	CTTTCTTTAG	AT GTT ACC	CTG TGT GAG	GAG GCA TTC	TTC AGG	6747

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

180

185

TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA 6795
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
190 195 200

GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA 6843
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
205 210 215

AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA 6891
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
220 225 230 235

TGG AAA CAT CAA AAC AAA GAC CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA G 6940
Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
240 245 250

GTAATTACAT TCCAAAATAC GTCTTTGTAC GATTTTGTAG TATCATCTCT CTCTCTGAGT 7000
TGAACACAAG GCCTCCAGCC ACATTCTTGG TCAAACCTTAC ATTTTCCCTT TCTTGAATCT 7060
TAACCAGCTA AGGCTACTCT CGATGCATTA CTGCTAAAGC TACCACTCAG AATCTCTCAA 7120
AAACTCATCT TCTCACAGAT AACACCTCAA AGCTTGATTT TCTCTCCTTT CACACTGAAA 7180
TCAAATCTTG CCCATAGGCA AAGGGCAGTG TCAAGTTTGC CACTGAGATG AAATTAGGAG 7240
AGTCCAAACT GTAGAATTCA CGTTGTGTGT TATTACTTTC ACGAATGTCT GTATTATTAA 7300
CTAAAGTATA TATTGGCAAC TAAGAAGCAA AGTGATATAA ACATGATGAC AAATTAGGCC 7360
AGGCATGGTG GCTTACTCCT ATAATCCCAA CATTTTGGGG GGCCAAGGTA GGCAGATCAC 7420
TTGAGGTCAG GATTTCAGA CCAGCCTGAC CAACATGGTG AAACCTTGTC TCTACTAAAA 7480

ATACAAAAAT	TAGCTGGGCA	TGGTAGCAGG	CACTTCTAGT	ACCAGCTACT	CAGGGCTGAG	7540
GCAGGAGAAT	CGCTTGAACC	CAGGAGATGG	AGGTTGCAGT	GAGCTGAGAT	TGTACCACTG	7600
CACTCCAGTC	TGGGCAACAG	AGCAAGATTT	CATCACACAC	ACACACACAC	ACACACACAC	7660
ACACATTAGA	AATGTGTACT	TGGCTTTGTT	ACCTATGGTA	TTAGTGCATC	TATTGCATGG	7720
AACTTCCAAG	CTACTCTGGT	TGTGTTAAGC	TCTTCATTGG	GTACAGGTCA	CTAGTATTAA	7780
G TTCAGGTTA	TTCGGATGCA	TTCCACGGTA	GTGATGACAA	TTCATCAGGC	TAGTGTGTGT	7840
G TTCACCTTG	TCACTCCCAC	CACTAGACTA	ATCTCAGACC	T TCACTCAAA	GACACATTAC	7900
ACTAAAGATG	ATTTGCTTTT	TTGTGTTTAA	TCAAGCAATG	GTATAAACCA	GCTTGACTCT	7960
CCCCAAACAG	TTTTTCGTAC	TACAAAGAAG	TTTATGAAGC	AGAGAAATGT	GAATTGATAT	8020
ATATATGAGA	TTCTAACCCA	GTTCCAGCAT	TGTTTCATTG	TGTAATTGAA	ATCATAGACA	8080
AGCCATTTTA	GCCTTTGCTT	TCTTATCTAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAATGA	AGGAAGGGGT	8140
ATTAAAAGGA	GTGATCAAAT	TTTAACATTC	TCTTTAATTA	ATTCATTTTT	AATTTTACTT	8200
TTTTTCATTT	ATTGTGCACT	TACTATGTGG	TACTGTGCTA	TAGAGGCTTT	AACATTTATA	8260
AAAACACTGT	GAAAGTTGCT	TCAGATGAAT	ATAGGTAGTA	GAACGGCAGA	ACTAGTATTC	8320
AAAGCCAGGT	CTGATGAATC	CAAAAACAAA	CACCCATTAC	TCCCATTTTC	TGGGACATAC	8380
TTACTCTACC	CAGATGCTCT	GGGCTTTGTA	ATGCCTATGT	AAATAACATA	GTTTTATGTT	8440
TGGTTATTTT	CCTATGTAAT	GTCTACTTAT	ATATCTGTAT	CTATCTCTTG	CTTTGTTTCC	8500
AAAGGTAAAC	TATGTGTCTA	AATGTGGGCA	AAAAATAACA	CACTATTCCA	AATTACTGTT	8560
CAAATTCCTT	TAAGTCAGTG	ATAATTATTT	GTTTTGACAT	TAATCATGAA	GTCCCTGTG	8620
GGTACTAGGT	AAACCTTTAA	TAGAATGTTA	ATGTTTGTAT	TCATTATAAG	AATTTTGGC	8680
TGTTACTTAT	TTACAACAAT	ATTTCACTCT	AATTAGACAT	TTACTAAACT	TTCTCTTGAA	8740
AACAATGCCC	AAAAAAGAAC	ATTAGAAGAC	ACGTAAGCTC	AGTTGGTCTC	TGCCACTAAG	8800
ACCAGCCAAC	AGAAGCTTGA	TTTTATTCAA	ACTTTGCATT	TTAGCATATT	TTATCTTGGA	8860
AAATTCAATT	GTGTTGGTTT	TTTGTTTTTG	TTTGTATTGA	ATAGACTCTC	AGAAATCCAA	8920
TTGTTGAGTA	AATCTTCTGG	GTTTTCTAAC	CTTTCTTTAG	AT ATT GAC CTC TGT		8974

Asp Ile Asp Leu Cys

255

GAA AAC AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC TTC GAG 9022
 Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu
 260 265 270

CAG CTT CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG GGA GCA 9070
 Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala
 275 280 285

GAA GAC ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC CAG ATC 9118
 Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile
 290 295 300

CTG AAG CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA GAC ACC 9166
 Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr
 305 310 315 320

TTG AAG GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC CAC TTT 9214
 Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe
 325 330 335

CCC AAA ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC CTT CAC 9262
 Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His
 340 345 350

AGC TTC ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA ATG ATA 9310
 Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile
 355 360 365

GGT AAC CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA TAACTGGAAA 9356

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

370

375

380

TGGCCATTGA GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGAGTAA ACTGTTTCTC 9416

AGGCACTTGA GGCTTTCAGT GATATCTTTC TCATTACCAG TGACTAATTT TGCCACAGGG 9476

TACTAAAAGA AACTATGATG TGGAGAAAGG ACTAACATCT CCTCCAATAA ACCCCAAATG 9536

GTTAATCCAA CTGTCAGATC TGGATCGTTA TCTACTGACT ATATTTTCCC TTATTACTGC 9596

TTGCAGTAAT TCAACTGGAA ATTAAAAAAA AAAAACTAGA CTCCACTGGG CCTTACTAAA 9656

TATGGGAATG TCTAACTTAA ATAGCTTTGG GATTCCAGCT ATGCTAGAGG CTTTTATTAG 9716

AAAGCCATAT TTTTTTCTGT AAAAGTTACT AATATATCTG TAACACTATT ACAGTATTGC 9776

TATTTATATT CATTGAGATA TAAGATTGG ACATATTATC ATCCTATAAA GAAACGGTAT 9836

GACTTAATTT TAGAAAGAAA ATTATATTCT GTTTATTATG ACAAATGAAA GAGAAAATAT 9896

ATATTTTTTAA TGGAAAGTTT GTAGCATTTT TCTAATAGGT ACTGCCATAT TTTTCTGTGT 9956

GGAGTATTTT TATAATTTTA TCTGTATAAG CTGTAATATC ATTTTATAGA AAATGCATTA 10016

TTTAGTCAAT TGTTTAATGT TGGAAAACAT ATGAAATATA AATTATCTGA ATATTAGATG 10076

CTCTGAGAAA TTGAATGTAC CTTATTTAAA AGATTTTATG GTTTTATAAC TATATAAATG 10136

ACATTATTAA AGTTTTCAAA TTATTTTTTA TTGCTTCTC TGTTGCTTTT ATTT 10190

請 求 の 範 囲

1. 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。
 - (a) 分子量 (SDS-PAGEによる) ; 約60kD (還元条件下)、約60kD及び約120 kD (非還元条件下)
 - (b) 親和性 ; 陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。
 - (c) 熱安定性 ; 70℃、10分間又は56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。
 - (d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号1～3のアミノ酸配列をもつ。
2. N末端配列が配列表 配列番号7のアミノ酸配列で示される、請求項1記載の蛋白質。
3. ヒト線維芽細胞が産生する、請求項1記載の蛋白質。
4. ヒト線維芽細胞を細胞培養し、培養液をイオン交換カラム、アフィニティークラム及び逆相カラムへの吸着及び溶出を行なって精製することを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の蛋白質の製造方法。
5. アルミナセラミック片を担体として使用して細胞培養を行なう請求項4記載の蛋白質の製造方法。
6. 配列表 配列番号4のアミノ酸配列で示される蛋白質。
7. 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNA。
8. 配列表 配列番号6の塩基配列で示されるcDNA。
9. 配列表 配列番号6の塩基配列で示されるcDNAと比較的温和な条件下でハイブリダイズするDNA。
10. 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列をコードするcDNAが発現された蛋白質。
11. 配列表 配列番号4で示されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するア

ミノ酸配列をコードする cDNA が発現されることにより得られる、破骨細胞分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。

12. 配列表 配列番号 4 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA を遺伝子として用いて、次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法。

(a) 分子量 (SDS-PAGE による) ; 約 60kD (還元条件下)、約 60kD 及び約 120 kD (非還元条件下)

(b) 親和性 ; 陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(c) 熱安定性 ; 70℃、10 分間又は 56℃、30 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下し、90℃、10 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

(d) アミノ酸配列 ; 内部アミノ酸配列として配列表 配列番号 1 ~ 3 のアミノ酸配列をもつ。

13. 宿主細胞として哺乳動物細胞を用いて請求項 10 記載の蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法。

14. 宿主細胞が 293/EBNA 細胞又は CHO 細胞である、請求項 13 記載の蛋白質を遺伝子工学的に製造する方法。

15. 配列表 配列番号 8 の塩基配列で示される cDNA。

16. 配列表 配列番号 8 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。

17. 配列表 配列番号 9 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。

18. 配列表 配列番号 10 の塩基配列で示される cDNA。

19. 配列表 配列番号 10 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。

20. 配列表 配列番号 11 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。

21. 配列表 配列番号 12 の塩基配列で示される cDNA。

22. 配列表 配列番号 12 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。

23. 配列表 配列番号 1 3 で示されるアミノ酸配列をコードする c D N A。
24. 配列表 配列番号 1 4 の塩基配列で示される c D N A。
25. 配列表 配列番号 1 4 の塩基配列で示される c D N A を発現することにより得られる蛋白質。
26. 配列表 配列番号 1 5 で示されるアミノ酸配列をコードする c D N A。
27. 配列表 配列番号 8 3 の塩基配列で示される c D N A。
28. 配列表 配列番号 8 3 の塩基配列で示される c D N A を発現することにより得られる蛋白質。
29. 配列表 配列番号 6 2 で示されるアミノ酸配列をコードする c D N A。
30. 配列表 配列番号 8 4 の塩基配列で示される c D N A。
31. 配列表 配列番号 8 4 の塩基配列で示される c D N A を発現することにより得られる蛋白質。
32. 配列表 配列番号 6 3 で示されるアミノ酸配列をコードする c D N A。
33. 配列表 配列番号 8 5 の塩基配列で示される c D N A。
34. 配列表 配列番号 8 5 の塩基配列で示される c D N A を発現することにより得られる蛋白質。
35. 配列表 配列番号 6 4 で示されるアミノ酸配列をコードする c D N A。
36. 配列表 配列番号 8 6 の塩基配列で示される c D N A。
37. 配列表 配列番号 8 6 の塩基配列で示される c D N A を発現することにより得られる蛋白質。
38. 配列表 配列番号 6 5 で示されるアミノ酸配列をコードする c D N A。
39. 配列表 配列番号 8 7 の塩基配列で示される c D N A。
40. 配列表 配列番号 8 7 の塩基配列で示される c D N A を発現することにより得られる蛋白質。
41. 配列表 配列番号 6 6 で示されるアミノ酸配列をコードする c D N A。
42. 配列表 配列番号 8 8 の塩基配列で示される c D N A。
43. 配列表 配列番号 8 8 の塩基配列で示される c D N A を発現することにより得られる蛋白質。

44. 配列表 配列番号 67 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
45. 配列表 配列番号 89 の塩基配列で示される cDNA。
46. 配列表 配列番号 89 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
47. 配列表 配列番号 68 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
48. 配列表 配列番号 90 の塩基配列で示される cDNA。
49. 配列表 配列番号 90 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
50. 配列表 配列番号 69 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
51. 配列表 配列番号 91 の塩基配列で示される cDNA。
52. 配列表 配列番号 91 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
53. 配列表 配列番号 70 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
54. 配列表 配列番号 92 の塩基配列で示される cDNA。
55. 配列表 配列番号 92 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
56. 配列表 配列番号 71 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
57. 配列表 配列番号 93 の塩基配列で示される cDNA。
58. 配列表 配列番号 93 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
59. 配列表 配列番号 72 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
60. 配列表 配列番号 94 の塩基配列で示される cDNA。
61. 配列表 配列番号 94 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
62. 配列表 配列番号 73 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
63. 配列表 配列番号 95 の塩基配列で示される cDNA。
64. 配列表 配列番号 95 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。

65. 配列表 配列番号 74 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
66. 配列表 配列番号 96 の塩基配列で示される cDNA。
67. 配列表 配列番号 96 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
68. 配列表 配列番号 75 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
69. 配列表 配列番号 97 の塩基配列で示される cDNA。
70. 配列表 配列番号 97 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
71. 配列表 配列番号 76 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
72. 配列表 配列番号 98 の塩基配列で示される cDNA。
73. 配列表 配列番号 98 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
74. 配列表 配列番号 77 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
75. 配列表 配列番号 99 の塩基配列で示される cDNA。
76. 配列表 配列番号 99 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
77. 配列表 配列番号 78 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
78. 配列表 配列番号 100 の塩基配列で示される cDNA。
79. 配列表 配列番号 100 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
80. 配列表 配列番号 79 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
81. 配列表 配列番号 101 の塩基配列で示される cDNA。
82. 配列表 配列番号 101 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
83. 配列表 配列番号 80 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
84. 配列表 配列番号 102 の塩基配列で示される cDNA。
85. 配列表 配列番号 102 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。

86. 配列表 配列番号 81 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
87. 配列表 配列番号 103 の塩基配列で示される cDNA。
88. 配列表 配列番号 103 の塩基配列で示される cDNA を発現することにより得られる蛋白質。
89. 配列表 配列番号 82 で示されるアミノ酸配列をコードする cDNA。
90. 配列表 配列番号 4 のアミノ酸配列をコードするゲノム DNA。
91. 配列表 配列番号 104 及び 105 の塩基配列で示される、請求項 90 記載のゲノム DNA。
92. ヒト破骨細胞形成抑制因子に対し、特異的親和性を示す抗体。
93. 抗体がポリクローナル抗体である、請求項 92 記載の抗体。
94. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 92 記載の抗体。
95. 分子量約 150,000、サブクラス IgG₁、IgG_{2a} 或いは IgG_{2b} である、請求項 94 記載のモノクローナル抗体。
96. 請求項 92～96 のいずれかに記載の抗体を用いることを特徴とする、ヒト破骨細胞形成抑制因子の測定方法。

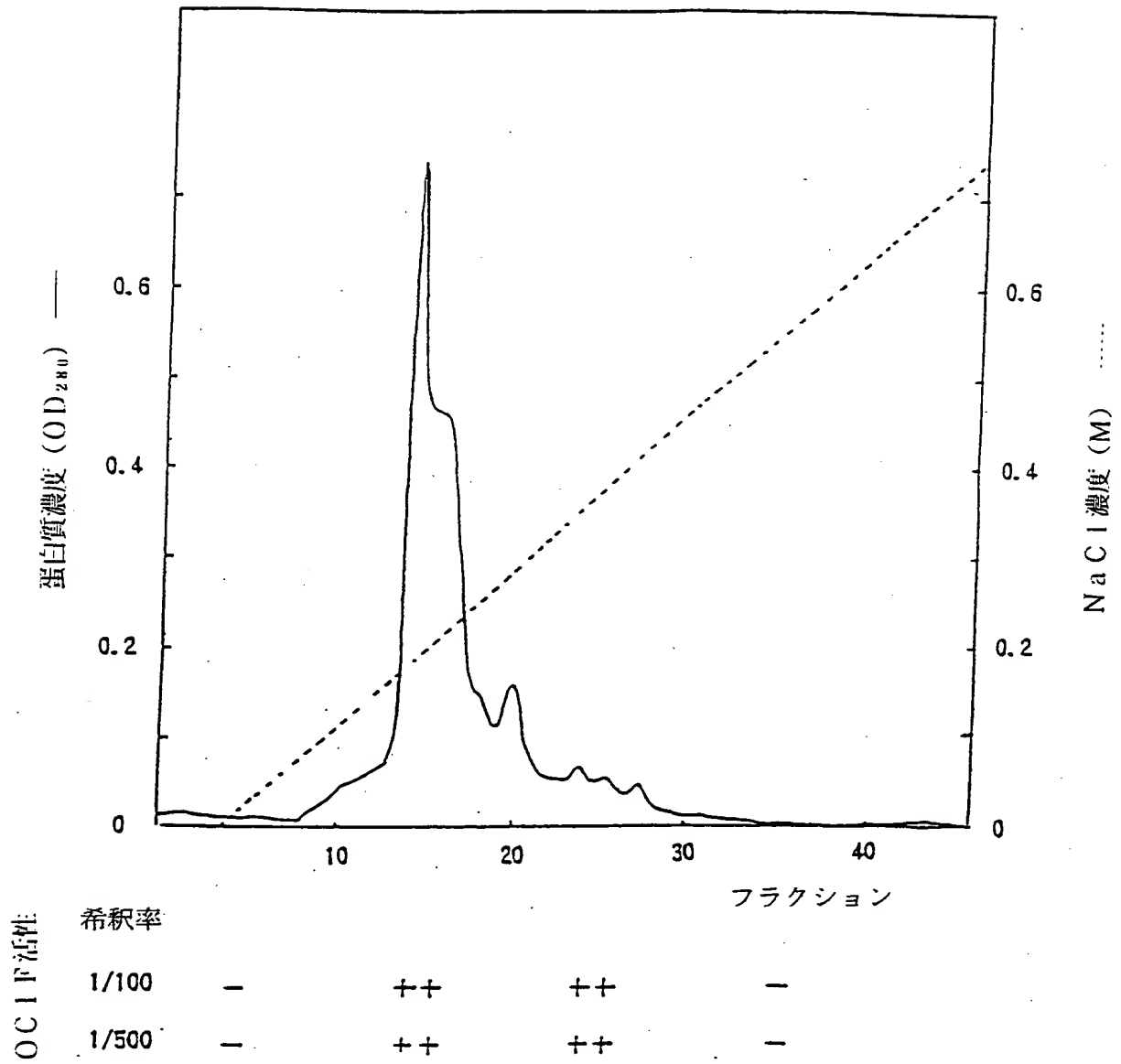
要 約 書

破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質及びその製造法。

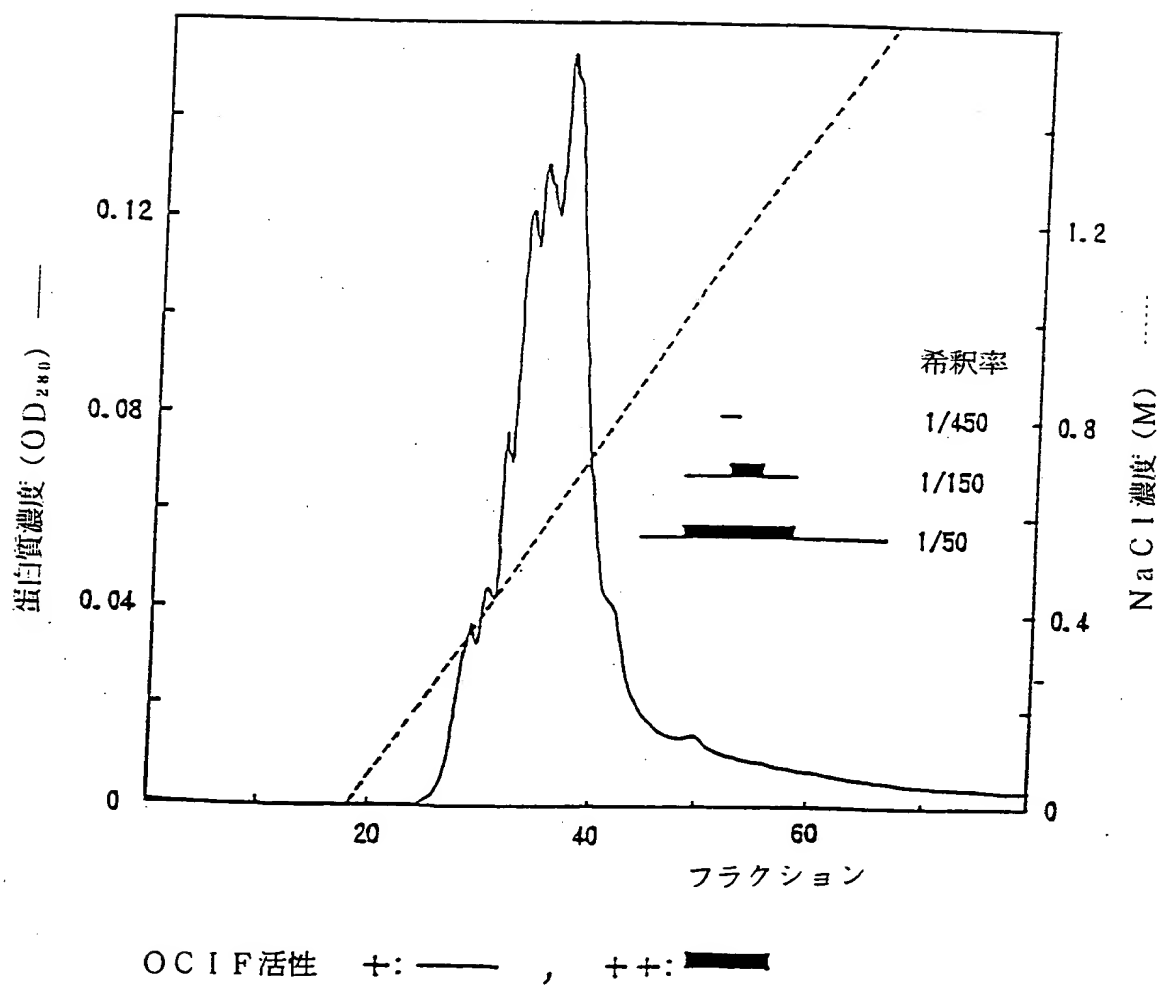
この蛋白質は、ヒト胎児肺線維芽細胞より産生され、還元条件下約60KD、非還元条件下約120KD の分子量をもつ。この蛋白質は該細胞の培養液から単離精製することができる。また、遺伝子工学的に製造することができる。

本発明では、遺伝子工学的に製造するための c D N A、あるいはこの蛋白質と特異的親和性を示す抗体、この抗体を用いる蛋白質の測定方法も含まれる。

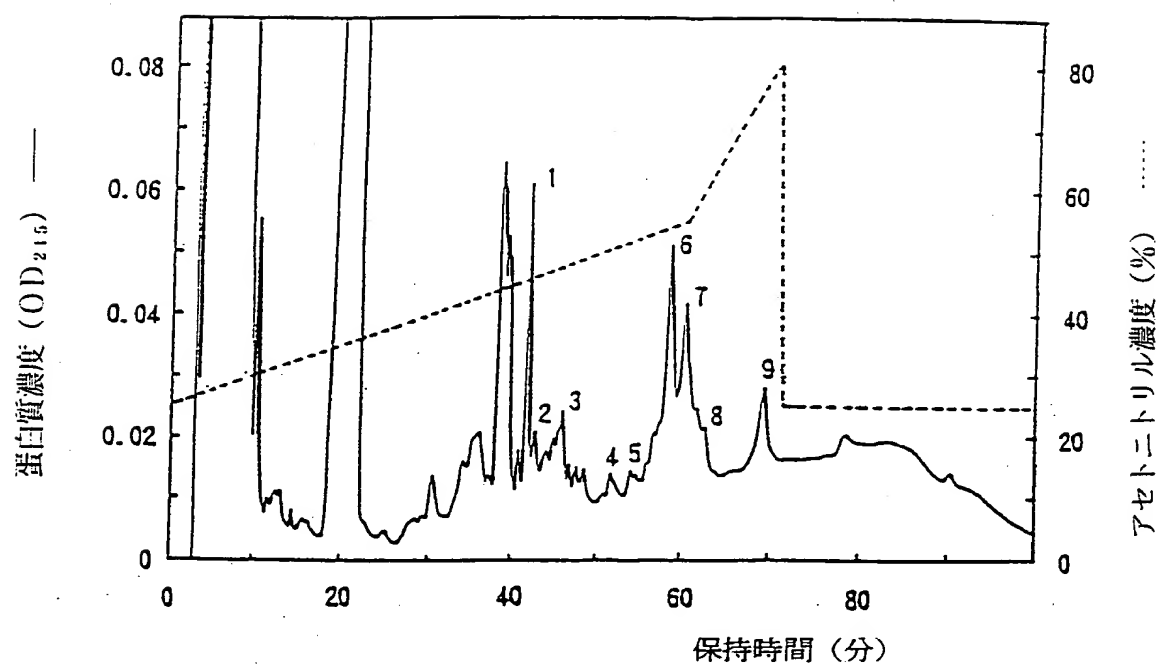
第 1 図



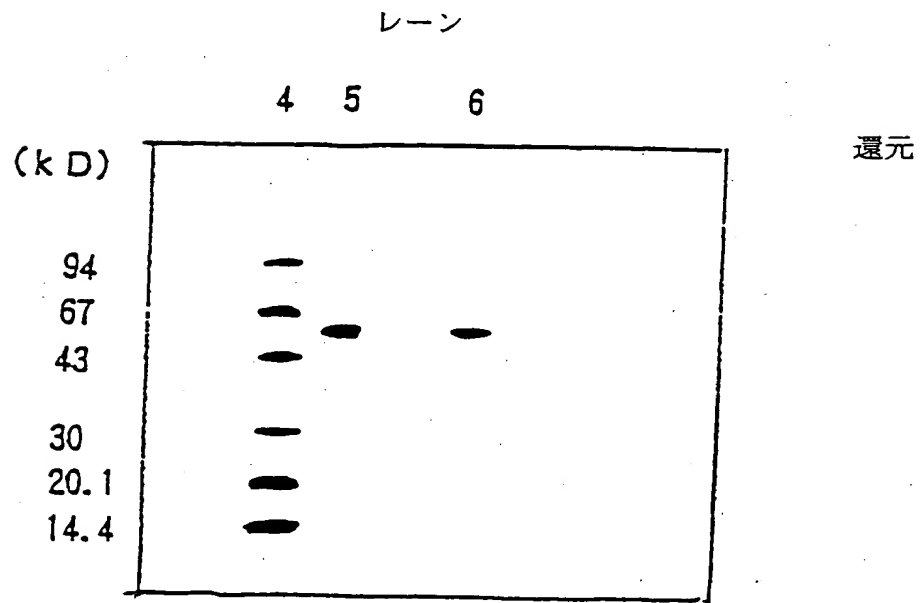
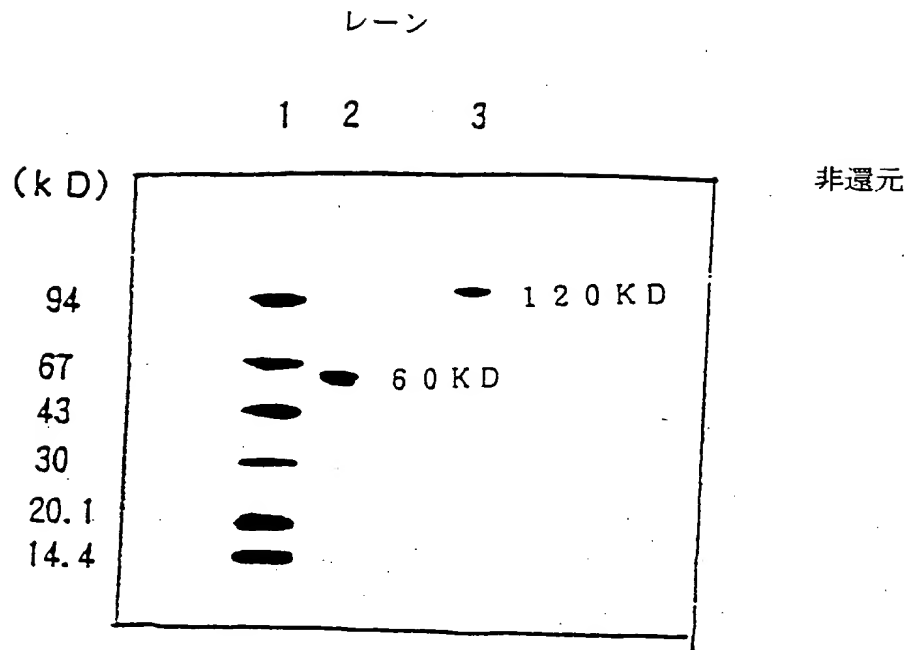
第 2 図



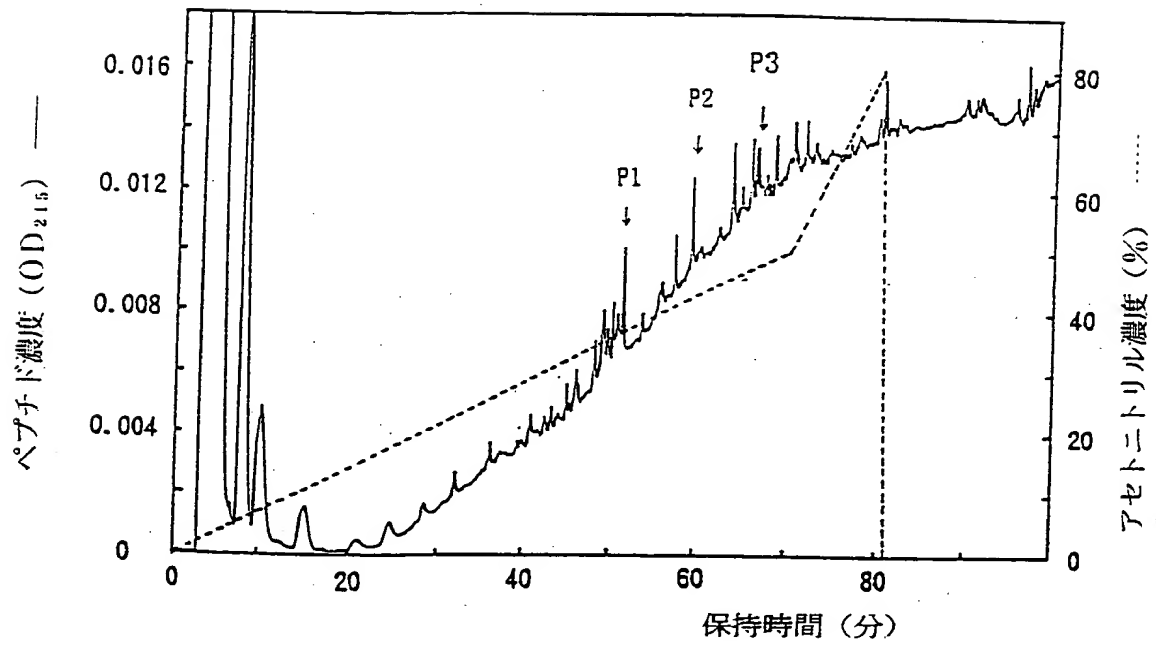
第 3 図



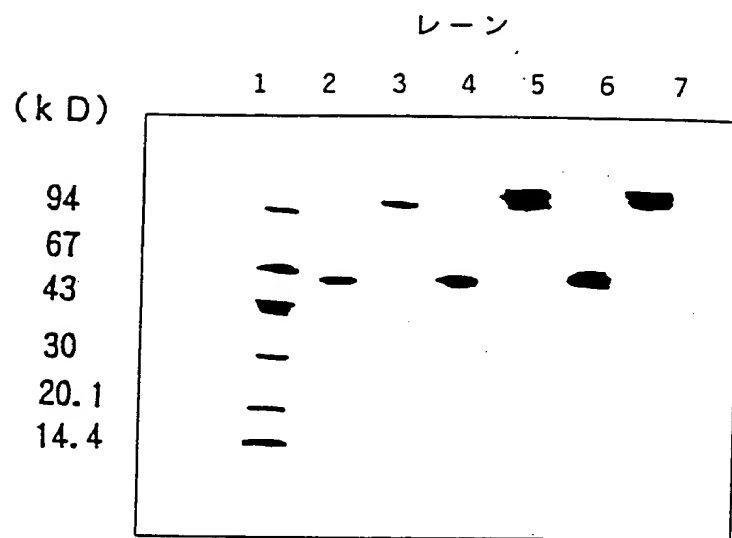
第 4 図



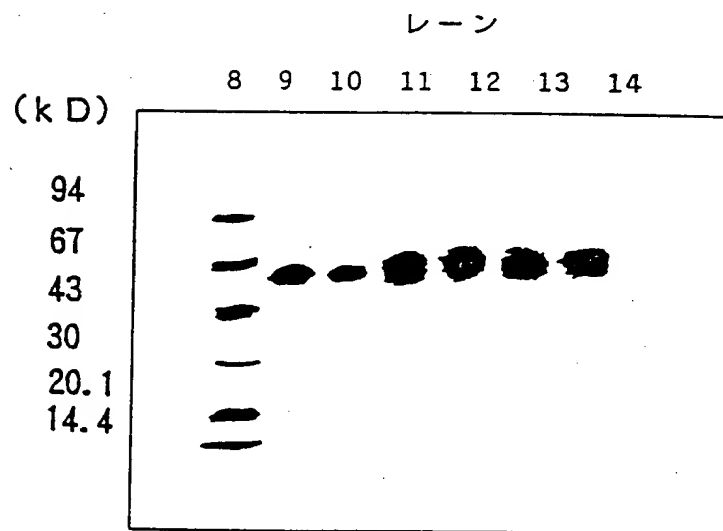
第 5 図



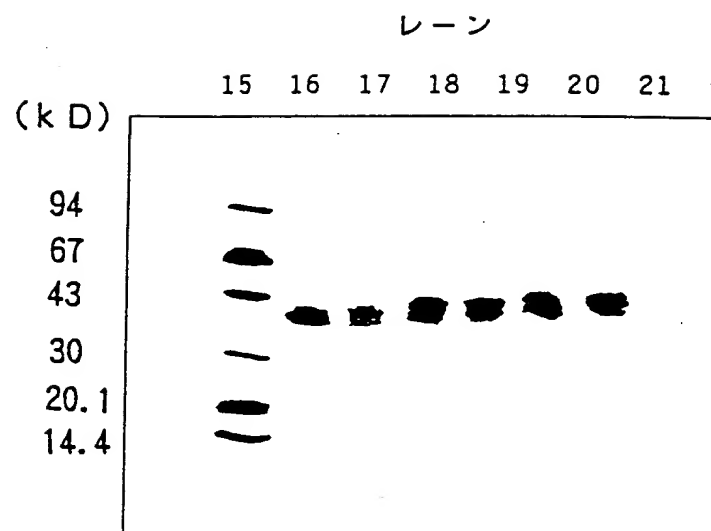
第 6 図



第 7 図



第 8 図



第 9 区

1
MNNLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF1)

MNNLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF2)
1

61
VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF1)

VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKE-----CNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF2)
61

121
HRSCPPGFGVVQAGTPERN TVCKRCPDGFFSNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNAT (OCIF1)

HRSCPPGFGVVQAGTPERN TVCKRCPDGFFSNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNAT (OCIF2)
114

181
HDNICS GNSESTQKCGIDVTLCEEAFRFAVPTKFTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERI (OCIF1)

HDNICS GNSESTQKCGIDVTLCEEAFRFAVPTKFTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERI (OCIF2)
174

241
KRQHSSQEQT FQLLKLWKHQNKDQDIVKKIIQDIDLCENSVQRHIGHANLTFEQLRSLME (OCIF1)

KRQHSSQEQT FQLLKLWKHQNKDQDIVKKIIQDIDLCENSVQRHIGHANLTFEQLRSLME (OCIF2)
234

301
SLPGKKVGAEDIEKTIKACKPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMHALKH SKTYHFPKT (OCIF1)

SLPGKKVGAEDIEKTIKACKPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMHALKH SKTYHFPKT (OCIF2)
294

361
VTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL (OCIF1)

VTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL (OCIF2)
354

第 1 0 页

1
MNNLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF1)
** *****
MNNLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF3)
1

61
VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF1)

VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF3)
61

121
HRSCPPGFGVVQAGTPERN TVCKRCPDGFFSNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNAT (OCIF1)

HRSCPPGFGVVQAGTPERN TVCKRCPDGFFSNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNAT (OCIF3)
121

181
HDNICSGNSESTQKCGIDVTLCEEAFRRFAVPTKFTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERI (OCIF1)

HDNICSGNSESTQKCGIDVTLCEEAFRRFAVPTKFTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERI (OCIF3)
181

241
KRQHSSQEQTQFQLLKLWKHQNKDQDIVKKIIQDIDLCENSVQRHIGHANLTFEQLRSLME (OCIF1)

KRQHSSQEQTQFQLLKLWKHQNKDQDIVKKIIQDIDLCENSVQRHIGHANLS----- (OCIF3)
241

301
SLPGKKVGAEDIEKTIKACKPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMHALKHSHKTYHFPKT (OCIF1)

-----LWRIKNGDQDTLKGLMHALKHSHKTYHFPKT (OCIF3)
292

361
VTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL (OCIF1)

VTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKISCL (OCIF3)
322

第 1 1 図

1
MNNLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF1)
** *****
MNKLLCCSLVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF4)
1
61
VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF1)

VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF4)
61
121
HRSCPPGFGVVQAGTPERN TVCKRCPDGFFSNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNAT (OCIF1)

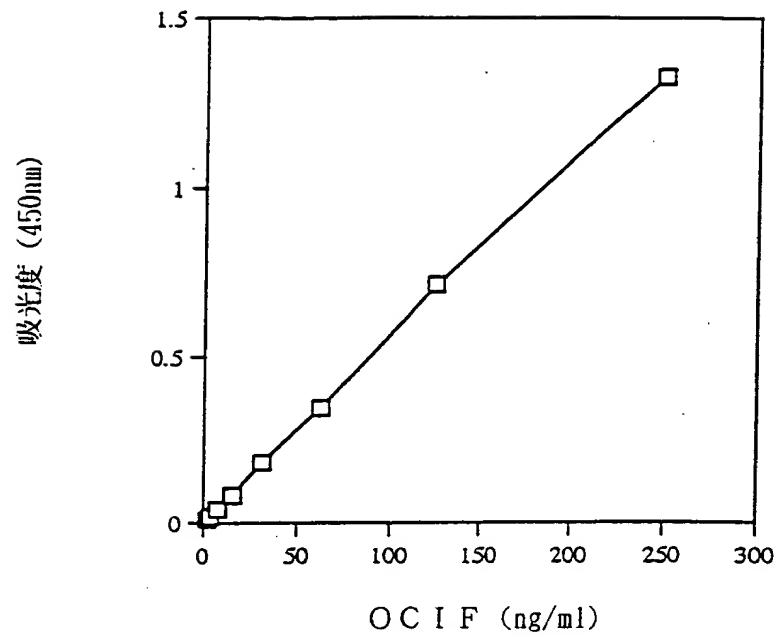
HRSCPPGFGVVQAGTCQCAAKLIRIMQSQIVTV (OCIF4)
121

第 1 2 図

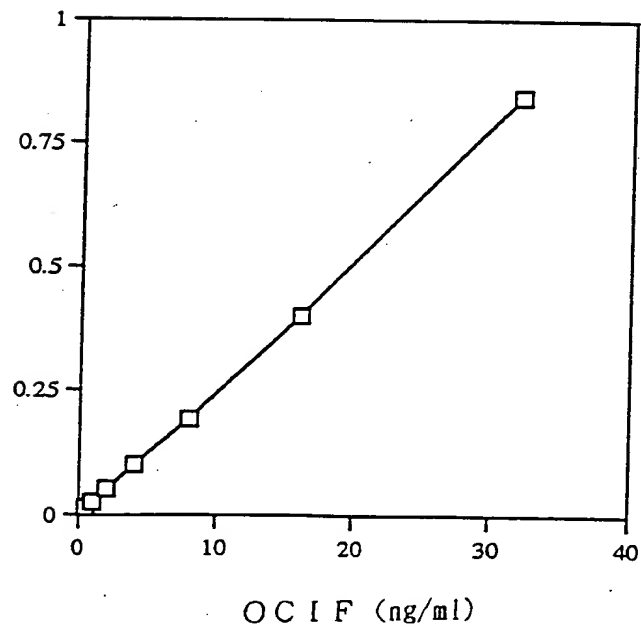
1
MNNLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF1)
** *****
MNKLLCCALVFLDISIKWTTQETFPKYLHYDEETSHQLLCDKCPPGTYLKQHCTAKWKT (OCIF5)
1
61
VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF1)

VCAPCPDHYYTDSWHTSDECLYCSPVCKELQYVKQECNRTHNRVCECKEGRYLEIEFCLK (OCIF5)
61
121
HRSCPPGFGVVQAGTPERN TVCKRCPDGFFSNETSSKAPCRKHTNCSVFGLLLTQKGNAT (OCIF1)
***** *
HRSCPPGFGVVQAGCRRRPKPQICI (OCIF5)
121

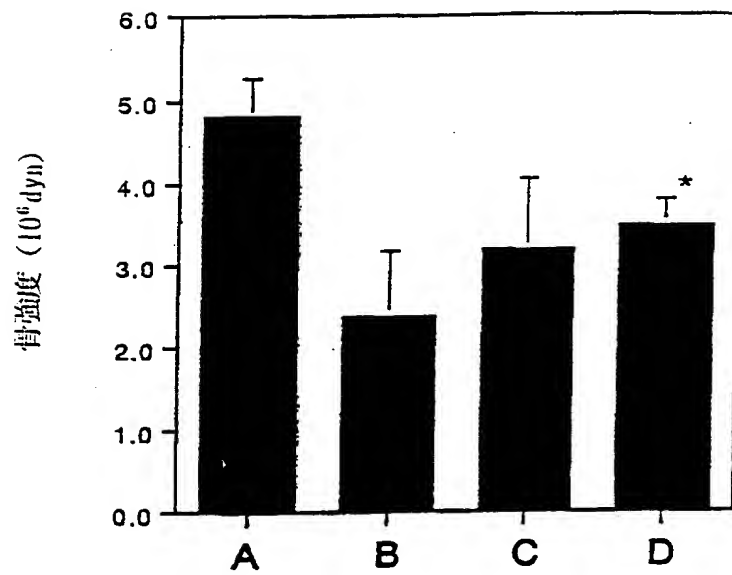
第 1 3 図



第 1 4 図



第 1 5 図



A : 正常

B : 神経切除+溶媒

C : 神経切除+OCIF $10\mu\text{g/kg/day}$

C : 神経切除+OCIF $100\mu\text{g/kg/day}$